

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

**Charakterisierung neuer Funktionen
der mRNA-Exportfaktoren Npl3p und Dbp5p
in der Translation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der



vorgelegt

von

Thomas Groß

aus Berlin

Marburg an der Lahn, Mai 2009

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität als Dissertation am 18.12.2009
angenommen.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Heike Krebber

1. Korreferent: Prof. Dr. Roland Lill

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht oder werden zur Veröffentlichung vorbereitet:

Gross T., Siepmann A., Sturm D., Windgassen M., Scarcelli J.J., Seedorf M., Cole C.N., Krebber H. (2007): The DEAD-Box RNA Helicase Dbp5 functions in translation termination. *Science*, 315, 646-649

Gross T., Hackmann A., Baierlein C., Forster N., Krebber H.: The mRNA export factor Npl3p functions in the transport of mRNAs and large ribosomal subunits to support ribosomal subunit joining for translation. in Vorbereitung

Für meine Freundin Nicole

& meine Eltern

1 Einleitung	1
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	2
1.2 Die Transkription und Prozessierung der prä-mRNA	3
1.3 Der Kernporenkomplex	5
1.4 Der nukleäre Export und Import von Proteinen	7
1.5 Der Aufbau, die Biogenese und der nukleäre Export von Ribosomen	10
1.6 Der nukleäre Export der mRNA	14
1.7 Die Qualitätskontrolle und der Abbau der mRNA	18
1.8 Die Translation	20
1.9 Das SR-Protein Npl3p	25
1.10 Die DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p	28
1.11 Zielsetzungen dieser Arbeit	32
2 Materialien	33
2.1 Chemikalien	33
2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	33
2.3 Medien	35
2.3.1 Medien für Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	35
2.3.2 Medien für Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
2.4 Lösungen und Puffer	37
2.5 Stämme	42
2.5.1 Bakterienstämme	42
2.5.2 Hefestämme	42
2.6 Plasmide	46
2.7 Oligonukleotide	48
2.8 Enzyme	49
2.9 Antikörper	49
3 Methoden	50
3.1 Molekularbiologische Methoden	50
3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	50
3.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation	51
3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51
3.1.4 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA	51
3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	52

3.1.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	52
3.1.7	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Fragmentenden	52
3.1.8	Generierung von glatten DNA-Fragmentenden	53
3.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten	53
3.1.10	Polymerase-Kettenreaktion	54
3.1.11	Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR).....	54
3.1.12	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	55
3.1.13	<i>In vitro</i> Transkription	55
3.2	Methoden mit <i>S. cerevisiae</i>	56
3.2.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	56
3.2.2	Wachstumsanalyse von <i>S. cerevisiae</i>	56
3.2.3	Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	57
3.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	57
3.2.5	Plasmid-Extraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	58
3.2.6	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	58
3.2.7	Herstellung von <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen.....	59
3.2.7.1	Sporulation und Tetradendisektion.....	59
3.2.7.2	<i>In vivo</i> Epitop-Tagging von Proteinen	60
3.2.8	Dualer Luziferasereporterversuch	60
3.2.9	<i>In vivo</i> Translationsversuch.....	62
3.2.10	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.....	63
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	64
3.3.1	Lyse von <i>S. cerevisiae</i> und Proteinextraktion	64
3.3.2	Präzipitation von Proteinen	64
3.3.3	Proteinbestimmung nach Lowry	64
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	65
3.3.5	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	66
3.3.6	Western Blot.....	66
3.3.7	Immundetektion	67
3.3.8	Ko-Immunpräzipitation.....	67
3.3.9	Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen	69
3.3.10	<i>In vitro</i> Ko-Immunpräzipitation	70
3.3.11	<i>In vitro</i> RNA Ko-Immunpräzipitation.....	70

3.4	Immuncyto- und immunhistochemische Methoden	71
3.4.1	GFP-Mikroskopie.....	71
3.4.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung von mRNA.....	72
3.4.3	Immunfluoreszenz.....	73
4	Ergebnisse	75
4.1	Die Deletion von <i>NPL3</i> führt zu Translationsdefekten	75
4.2	Npl3p ist ein generelles Protein für den mRNA-Export.....	79
4.3	Npl3p transportiert die ribosomale prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma.....	82
4.4	Die Überexpression von <i>MTR2</i> und <i>NMD3</i> supprimiert den Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in <i>npl3Δ</i>	90
4.5	Der Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in <i>npl3Δ</i> wird nicht durch Prozessierungsdefekte hervorgerufen.....	92
4.6	Npl3p ist nicht an der Prozessierung der prä-60S- zur 60S-Untereinheit involviert.....	94
4.7	Die Deletion von <i>NPL3</i> führt zu Defekten im <i>Subunit Joining</i>	98
4.8	Npl3p unterstützt den Prozess des <i>Subunit Joinings</i> durch Homodimerisierung	101
4.9	Die Überexpression der carboxyterminalen Domäne von <i>NPL3</i> führt zu dominant-negativen Effekten	107
4.10	Dbp5p hat eine Funktion bei der Translation	112
4.10.1	Dbp5p hat eine Funktion bei der Translationstermination.....	114
4.10.2	Die katalytische Aktivität von Dbp5p wird bei der Translations-termination benötigt	119
4.11	Dbp5p hat keine offensichtliche Funktion im NMD-Prozess.....	126
4.12	Dbp5p reguliert die Sup45p-Sup35p-Interaktion und die Rekrutierung von Sup35p in den Terminationskomplex	129
5	Diskussion	135
5.1	Npl3p ist ein genereller Exportfaktor für die mRNA.....	135
5.2	Npl3p ist ein neuer Exportfaktor für die ribosomale prä-60S-Untereinheit.....	137
5.2.1	Npl3p ist nicht an der rRNA-Prozessierung im <i>BY</i> -Stammhintergrund beteiligt	139
5.2.2	Npl3p fungiert unabhängig von Mex67p-Mtr2p und Nmd3p-Xpo1p beim Export der ribosomalen prä-60S-Untereinheit.....	141
5.3	Npl3p unterstützt den <i>Subunit Joining</i> Prozess während der Translation.....	142

5.3.1 Npl3p unterstützt den <i>Subunit Joining</i> Prozess durch Homo-dimerisierung	144
5.3.2 Npl3p interagiert erst beim <i>Subunit Joining</i> Prozess mit der ribosomalen 40S-Untereinheit	145
5.4 Npl3p ist ein multifunktionelles Protein	146
5.5 Der mRNA-Exportfaktor Dbp5p hat eine zusätzliche Funktion in der Translationstermination	149
5.5.1 Dbp5p reguliert die Interaktion der beiden Translationsterminationsfaktoren Sup45p und Sup35p	151
5.5.2 Die katalytische Aktivität von Dbp5p wird für die Translations-termination benötigt	153
5.5.3 Erweiterte Modelle der Funktionsweise von Dbp5p bei der Translations-termination	155
5.6 Dbp5p hat keinen Einfluss auf den NMD-Prozess	159
5.7 Dbp5p ist ein genereller Terminationsfaktor	162
6 Zusammenfassung	164
6.1 Deutsche Zusammenfassung	164
6.2 <i>English Summary</i>	166
7 Referenzen	168
8 Anhang	190
8.1 Abkürzungen	190
8.2 Lebenslauf	195
8.3 Akademische Lehrer	196
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung	197
8.5 Danksagung	199

1 Einleitung

Ein zentrales Kennzeichen von eukaryontischen Zellen ist deren Unterteilung in einzelne Kompartimente, bei der abgetrennte Reaktionsräume entstehen. Diese Kompartimentierung führte im Laufe der Entwicklung zu einer erhöhten genetischen Variabilität und war eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung von hochkomplexen und vielzelligen Lebensformen (Gorlich und Kutay, 1999). Zum einen gestattet diese räumliche Unterteilung eine höhere Effizienz und Stabilität sowie eine verbesserte, wenn auch komplexere Regulation der verschiedenen zellulären Prozesse. Zum anderen ist die Ausbildung von effizienten Transportsystemen erforderlich, um beispielsweise eine koordinierte und regulierte Genexpression zu ermöglichen.

Die Expression von Genen umfasst mehrere Schritte, bei denen die im Zellkern kodierte Erbinformation in Form der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) zum phänotypisch erkennbaren Ausdruck gelangt. Dieser Ablauf folgt dem „zentralen Dogma der Molekularbiologie“, nach dem die Information in Nukleinsäuren vererbt und übertragen wird. Bei der Vererbung wird die DNA-Doppelhelix semikonservativ in zwei identische Kopien dupliziert und auf segregierende Zellen aufgeteilt. Während der Genexpression erfolgt im Zellkern zunächst die Transkription, bei der ein Strang der DNA als Matrize für die Synthese eines komplementären Stranges, der Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*, mRNA), dient. Die aus der DNA entstandene mRNA enthält die genetische Information, die während der im Zytoplasma an den Ribosomen stattfindenden Translation in eine Aminosäuresequenz übersetzt und somit für die Synthese eines Proteins genutzt wird.

Für die Translation ist der Transport der mRNA in das Zytoplasma erforderlich, da der Zellkern durch die Kernmembran, eine Doppelmembran, die kontinuierlich in das endoplasmatische Retikulum übergeht, vom Zytoplasma separiert wird. In der Kernmembran befinden sich Multiproteinkomplexe, die Kernporenkomplexe (*nuclear pore complexe*, NPC's), die eine Vielzahl von nukleozytoplasmatischen Transportprozessen zwischen den beiden Kompartimenten, dem Zellkern und dem Zytoplasma, ermöglichen. Neben dem nukleären Export der mRNA werden weitere RNA-Typen, wie die transfer-RNA (tRNA) oder die ribosomale-RNA (rRNA), ins Zytoplasma transportiert. Proteine mit nukleären Funktionen, beispielsweise bei der Transkription, dem Spleißen der mRNA oder der rRNA-Prozessierung, sowie Histone werden dagegen in den Zellkern importiert.

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) gehört in die Klasse der Ascomyceten und umfasst die während der Meiose gebildeten Sporen mit einem rundlichen oder schlauchförmigen Askus. *S. cerevisiae* weist mehrere Eigenschaften auf, die diesen Organismus bereits seit 1970 als ein bevorzugtes Forschungsobjekt niederer Eukaryonten auszeichnen. Dieser Einzeller vermehrt sich über Knospenbildung und durchläuft den Zellzyklus in ca. 90 Minuten. Neben der schnellen Teilungsrate sind Hefezellen in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen und diese zusätzlich durch homologe Rekombination in ihr Genom zu integrieren. Gleichzeitig sind zahlreiche Plasmide und Vektoren sowie Methoden und genetische Marker verfügbar, so dass für die Hefe effektive Techniken zur genetischen Manipulation etabliert wurden (Sambrook *et al.*, 2001; Ausubel *et al.*, 2002). *S. cerevisiae* kann sowohl in haploider als auch in diploider Form vorliegen, wobei letztere während der Meiose Sporen bildet, mit deren Hilfe die Vererbung genetischer Marker und Mutationen untersucht werden kann.

Da viele Grundmechanismen der eukaryontischen Zellen während der Evolution vom Einzeller zum Mehrzeller erhalten geblieben sind, werden noch heute eine Vielzahl von Prozessen und Fragestellungen der eukaryontischen Zelle, wie die Genexpression und deren Regulation, in *S. cerevisiae* eingehend untersucht. Mit ca. $1,3 \times 10^7$ Basenpaaren (16 Chromosomen) besitzt *S. cerevisiae* eines der einfachsten eukaryontischen Genome. Im Vergleich dazu umfasst das humane Genom etwa 3×10^9 Basenpaare und das Genom des Prokaryonten *Escherichia coli* (*E. coli*) nur etwa 4×10^6 Basenpaare. Seit dem Abschluss des Sequenzierprojektes (Goffeau *et al.*, 1996; Hieter *et al.*, 1996; Mewes *et al.*, 1997) ist das Genom von *S. cerevisiae* in Datenbanken frei zugänglich. Anhand der Sequenzdaten wurden etwa 6.300 offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF's) identifiziert. Ein Sequenzvergleich des *S. cerevisiae*-Genoms mit dem des Menschen identifizierte bislang etwa 700 homologe Gene, von denen derzeit ca. 100 mit menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Foury, 1997). Für knapp 1.500 der vorhergesagten ORF's sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine Funktionen bekannt (Costanzo *et al.*, 2000; Gavin *et al.*, 2006; King *et al.*, 2006).

Das Studium der grundlegenden Prozesse und der Regulation von Transkription, mRNA-Export sowie Translation in *S. cerevisiae* erweitert nicht nur das allgemeine Wissen über diese zellbiologischen Abläufe, sondern kann ebenso zu einem besseren molekular-medizinischen Verständnis für die Entstehung von Krankheiten führen. Beim Menschen wurden in den vergangenen Jahren bei zahlreichen Erkrankungen Mutationen in

nicht-kodierenden Genabschnitten gefunden (Maquat, 2001; Mendell und Dietz, 2001; Mendell *et al.*, 2004). Neben Mutationen im Promotor besitzen Mutationen in den untranslatierten Regionen (*untranslated regions*, UTR's) von mRNA's oder in Spleißstellen eine besondere Bedeutung. Die dadurch gestörte oder fehlerhafte Proteinbiosynthese kann zu einer veränderten Funktion oder Menge des Proteins führen, was unter Umständen im Organismus krankheitsauslösend wirken kann und von pathophysiologischer Bedeutung ist (Conne *et al.*, 2000). Weiterhin können Mutationen in regulatorischen Bereichen von mRNA's die Stabilität, Lokalisation und Translations-effizienz der mRNA beeinflussen. Eine unvollständige oder fehlerhafte Prozessierung der mRNA kann eine Ursache von neurodegenerativen Krankheiten oder Krebs sein. Beispielsweise können fehlerhafte mRNA's bestimmte myeloide Leukämien, wie Muskeldystrophie, oder amyloide Erkrankungen, wie Alzheimer oder Huntington, auslösen (Brajs, 2003; Faustino und Cooper, 2003). Da die grundlegenden Prozesse der eukaryontischen Genregulation von Mammalia auch in *S. cerevisiae* hoch-konserviert sind, werden aufgrund der einfachen Handhabung diese Vorgänge bevorzugt in diesem Modellorganismus untersucht.

1.2 Die Transkription und Prozessierung der prä-mRNA

Die Expression der genetischen Information in eukaryontischen Zellen umfasst mehrere komplexe Schritte, welche ein hohes Maß an Koordination und Regulation erfordern. Sie lassen sich in folgende Prozesse unterteilen: die Umstrukturierung des Chromatins (*chromatin remodeling*), die Transkription einschließlich der prä-mRNA-Prozessierung, der mRNA-Export, die Translation sowie der mRNA-Abbau (*mRNA turnover*). Der erste Schritt in der Expression ist die Transkription, bei dem die in der DNA gespeicherte genetische Information in die mRNA umgeschrieben wird. Die Synthese des primären einzelsträngigen Transkriptionsproduktes, die prä-mRNA, erfolgt durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II mit Hilfe zahlreicher Transkriptionsfaktoren.

Vor dem Transport der reifen mRNA als ein Bestandteil des exportkompetenten Ribonukleoproteinkomplexes (*messenger ribonucleoprotein particle*, mRNP) in das Zytoplasma erfolgen mehrere Prozessierungen. Bereits während der Synthese assoziieren zahlreiche Proteine mit der prä-mRNA, die eine Funktion bei der Prozessierung oder beim späteren nukleären Export besitzen (Jimeno *et al.*, 2002; Strasser *et al.*, 2002). Der erste Prozessierungsschritt unmittelbar nach Beginn des Transkriptionsstarts umfasst eine

kovalente Bindung eines 7-Methyl-Guanosin-Restes an das 5'-Ende der prä-mRNA. Dieser Vorgang wird auch als *5'-Capping* bezeichnet und dient zum Schutz vor dem Abbau durch 5'-Exonukleasen (Shuman, 2001; Neugebauer, 2002). Zum anderen ermöglicht dieser Prozess spätere Prozessierungsschritte (Lewis und Izaurralde, 1997). Die entstandene 5'-Kappe dient zusätzlich als Bindestelle für die beiden Proteine Cbp20p (CBP20 in Mammalia) und Cbp80p (CBP80 in Mammalia), die den so genannten Kappenbindungskomplex (*cap-binding complex*, CBC) bilden (Shen *et al.*, 2000; Raitskin *et al.*, 2002).

Ein weiterer Schritt der posttranskriptionellen Prozessierung ist der Spleißvorgang (*Splicing*), bei dem nicht-kodierende Intronsequenzen aus der prä-mRNA entfernt und die restlichen Exonsequenzen, die die Informationen für die Proteinbiosynthese enthalten, miteinander verknüpft werden. Dazu wird die prä-mRNA am 5'- und am 3'-Ende des Introns geschnitten und die Exons werden beiderseits der Spleißstellen kovalent miteinander verbunden. Der Spleißvorgang wird durch einen makromolekularen Komplex, dem Spleißapparat (*Spliceosome*), der aus kleinen nukleären Ribonukleoproteinpartikeln (*small nuclear ribonucleoprotein particles*, snRNP's) besteht, katalysiert. Über das *Spliceosom* wird in höheren Eukaryonten ein weiterer Multiproteinkomplex, der *Exon-Junction-Komplex* (*exon junction complex*, EJC), an die mRNA rekrutiert. Dieser bindet stromaufwärts der beiden Spleißstellen und interagiert mit zahlreichen mRNA-Exportfaktoren, um diese an die mRNA zu rekrutieren.

Zur Erhöhung der Stabilität, der Translationseffizienz und dem Schutz vor Abbau werden nach der Abspaltung des 3'-Endes der prä-mRNA an einem stromabwärts liegenden Polyadenylierungssignal Adenosinmonophosphat-Reste mit Hilfe der poly(A)-Polymerase kovalent an das 3'-Ende gebunden. Die Länge des poly(A)-Schwanzes, der bei dieser so genannten Polyadenylierung entsteht, variiert je nach Organismus (bei *S. cerevisiae* ca. 70-90 Nukleotide, bei Mammalia ca. 200-300 Nukleotide). Für die Entstehung von exportkompetenten mRNP's sind nicht nur diese posttranskriptionellen Modifikationen, sondern ebenso eine adäquate Verpackung der mRNA mit Hilfe von zahlreichen unterschiedlichen Proteinen erforderlich. Die mRNP's sind dynamische Strukturen, deren Proteinzusammensetzung variiert und an unterschiedliche Prozessierungsschritte angepasst wird. Ein geregelter und effizienter mRNA-Export ist nur dann gewährleistet, wenn die am Transport beteiligten Faktoren gezielt miteinander interagieren (Gorlich und Kutay, 1999). Neben der mRNA werden noch weitere RNA-Typen, wie die für die Translation benötigte tRNA, rRNA, aber auch kleine interferierende RNA's (*small interfering RNA's*, siRNA's) bzw.

micro-RNA (*micro RNA's*, miRNA's) im Zellkern (Nukleus, *nucleus*) oder Zellkernkörperchen (Nukleolus, *nucleolus*) transkribiert.

1.3 Der Kernporenkomplex

Der makromolekulare Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC) verbindet Zellkern und Zytoplasma miteinander. Er dient sowohl dem passiven Austausch von Ionen oder kleineren Molekülen mit einer Größe von bis zu 30 kDa, als auch dem regulierten Austausch von Makromolekülen, wie Proteinen oder RNA's. Der regulierte Transport von größeren und den meisten kleineren Molekülen erfolgt über ein selektives, direktionales sowie aktives und energieabhängiges Transportsystem (Ribbeck *et al.*, 1999; Zenklusen und Stutz, 2001). Die Anzahl der NPC's pro Zellkernmembran ist zum einen von der Größe und der Aktivität der Zelle, zum anderen von dem Zelltyp abhängig. Beispielsweise besitzen proliferierende Hefezellen ca. 200 NPC's (Rout und Blobel, 1993), während Mammaliazellen ca. 4.000 NPC's in der Zellkernmembran enthalten (Maul, 1977).

In *S. cerevisiae* besteht ein NPC aus ca. 30 Proteinen, den so genannten Nukleoporinen, und besitzt eine molekulare Masse von insgesamt 45-66 MDa (Rout und Blobel, 1993; Stoffler *et al.*, 1999; Rout *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu besitzt ein NPC in Vertebraten eine etwa doppelt so große molekulare Gesamtmasse von insgesamt 90-125 MDa und ist aus ungefähr 50 Nukleoporinen aufgebaut (Reichelt *et al.*, 1990; Fontoura *et al.*, 1999; Cronshaw *et al.*, 2002). Von ungefähr 70% der bislang beschriebenen Nukleoporine in *S. cerevisiae* wurden homologe Proteine in höheren eukaryontischen Zellen charakterisiert (Doye und Hurt, 1997; Stoffler *et al.*, 1999; Vasu und Forbes, 2001). Dies verdeutlicht einen evolutionär konservierten Translokationsmechanismus.

Des Weiteren weisen eukaryontische NPC's eine hoch-konservierte Grundstruktur auf (Abb. 1) (Yang *et al.*, 1998). Die Kernstruktur besteht aus dem Speichenring (*Spoke*), welcher auf der nukleären Seite über einen Ring mit dem so genannten nukleären Korb verknüpft ist und Kontakte zu nukleären Filamenten aufweist (Galy *et al.*, 2000; Kosova *et al.*, 2000; Kiseleva *et al.*, 2004). Auf der zytoplasmatischen Seite befindet sich ein ähnlich ringförmiger Proteinkomplex, der mit zytoplasmatischen Fibrillen des Zytoskelettes verbunden ist (Goldberg und Allen, 1995; Fahrenkrog *et al.*, 2001). Die Interaktionen mit den nukleären und zytoplasmatischen Filamenten haben sowohl eine strukturelle Bedeutung, als auch eine Funktion beim Transport von Import- bzw. Exportsubstraten zur Kernpore hin bzw. von der Kernpore weg. Im Zentrum des NPC's ist das zylindrische

Zentralelement, der zentrale Transporter, lokalisiert (Yang *et al.*, 1998; Stoffler *et al.*, 1999). Derzeit ist jedoch unklar, ob dies ein struktureller Teil der Kernpore ist oder es sich um Makromoleküle handelt, die durch die Kernpore transportiert werden (Allen *et al.*, 2000; Fahrenkrog *et al.*, 2001). Aufgrund der oktagonalen Rotationssymmetrie des NPC's kommen Nukleoporine in 8-, 16- oder 32-facher Ausführung am NPC vor. Viele dieser Proteine weisen sowohl auf der nukleoplasmatischen, als ebenfalls auf der zytoplasmatischen Seite eine gleichmäßige Verteilung auf, allerdings sind auch einseitig lokalisierte Nukleoporine beschrieben, wie Rat7p/Nup159p, Nup42p, Nup60p und Nup1p (Rout *et al.*, 2000; Fahrenkrog und Aebi, 2003). Diese einseitige Lokalisierung auf der nukleären oder zytoplasmatischen Seite der NPC's ermöglicht die Kontrolle der Transportrichtung (Denning *et al.*, 2001).

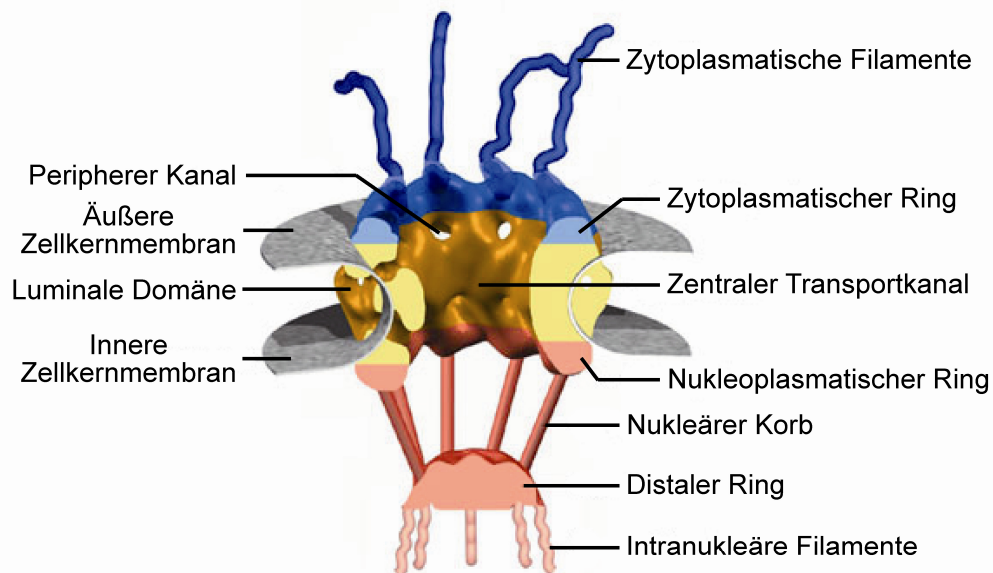


Abbildung 1: Dreidimensionales Modell eines NPC's.

Die strukturellen Komponenten des NPC's umfassen das Kernhüllen-durchspannende, oktagonale Zentralelement mit dem Transportkanal, der zytoplasmatischen sowie der nukleären Ringstruktur und dem nukleären Korb. Sowohl auf der zytoplasmatischen, als auch auf der nukleären Seite assoziieren filamentöse Strukturen mit dem NPC (modifiziert nach: Fahrenkrog und Aebi, 2003).

Der Transportkanal weist im Ruhezustand einen Durchmesser von 9 nm auf (Feldherr und Akin, 1997; Keminer und Peters, 1999). Dieser kann sich bei aktiven Transportprozessen auf bis zu 45 nm ausdehnen (Stoffler *et al.*, 2003). Demnach liegt die Ausschlussgröße der Substanzen, die passiv diffundieren, bei einem Durchmesser von ca. 40 nm (Pante und Kann, 2002). Die hohe Translokationsrate eines NPC's (80 MDa pro Sekunde) ist auf die Beteiligung mobiler Rezeptoren am aktiven Transport zurückzuführen (Ribbeck und Gorlich, 2001). Beim Transport der verschiedenen Substrate sind vorrangig Nukleoporine mit Phenylalanin-Glycin-(FG)-Motiven involviert (12 Nukleoporine in *S. cerevisiae*). Sie

scheinen bei aktiven Transportvorgängen sowohl durch Interaktionen mit Transportrezeptoren, als auch zur selektiven, hydrophoben Barriere von Bedeutung zu sein (Ryan und Wente, 2000; Wente, 2000; Rout und Aitchison, 2001; Stewart *et al.*, 2001; Zenklusen und Stutz, 2001; Jaggi *et al.*, 2003). Der komplexe Mechanismus der Translokation ist bislang nicht vollständig aufgeklärt.

1.4 Der nukleäre Export und Import von Proteinen

Der überwiegende Teil der aktiven Kerntransportprozesse wird durch Transportrezeptoren, den Karyopherinen, auch Transportine genannt, vermittelt. Diese pendeln zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma und werden je nach Richtung des vermittelten Transports in die Familien der Importine und der Exportine unterteilt (Mattaj und Englmeier, 1998; Pemberton *et al.*, 1998; Gorlich und Kutay, 1999; Kaffman und O'Shea, 1999; Fried und Kutay, 2003). Bislang wurden in *S. cerevisiae* 14 und in höheren Eukaryonten über 20 Karyopherine identifiziert. Viele dieser Karyopherine weisen eine unidirektionale Transportrichtung auf (Gorlich *et al.*, 1997; Rout *et al.*, 2000). Bislang sind wenige Karyopherine bekannt, die sowohl für den Import als auch für den Export von Substraten benutzt werden und somit die Effektivität des Transportzyklus optimieren (Mingot *et al.*, 2001; Yoshida und Blobel, 2001). Die Bindung des Substrates erfolgt über eine unkonservierte, carboxyterminale Domäne. Häufig wird der Kontakt zwischen Rezeptor und Substrat nicht direkt, sondern durch ein Adapterprotein vermittelt.

Der aktive, zielgerichtete Transport von Proteinen wird durch spezifische Transportsignale reguliert. Für den nukleären Import besitzen Proteine ein nukleäres Lokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS), wohingegen aus dem Zellkern zu exportierende Proteine ein nukleäres Exportsignal (*nuclear export signal*, NES) aufweisen. Diese Transportsignale sind spezifische Aminosäuresequenzen, die in ihrer Zusammensetzung und Größe variieren. Die Sequenzmotive des klassischen NLS bestehen aus basischen Aminosäuren, im Gegensatz zu NES-Sequenzen, die sich durch eine Ansammlung von hydrophoben Aminosäuren auszeichnen (Rout *et al.*, 2000). Einige Lokalisierungssignale weisen eine Redundanz auf. Daher können beispielsweise ribosomale Proteine nicht nur mit einem bestimmten, sondern mit verschiedenen Karyopherinen interagieren (Strom und Weis, 2001; Fried und Kutay, 2003). Die Karyopherine können einerseits über die Lokalisationssignale an die Transportsubstrate binden, andererseits mit den FG-Sequenzmotiven der Nukleoporene bei dem Translokationsprozess interagieren. Beim

Export von mRNA's kommt diesen Transportrezeptoren jedoch eine untergeordnete Rolle zu (Neville und Rosbash, 1999; Cullen, 2003).

Der Transport von Proteinen durch Karyopherine kann in einem energieabhängigen Prozess entgegen eines starken Konzentrationsgefälles ablaufen, obwohl der Translokationsvorgang anscheinend energieunabhängig und reversibel ist (Englmeier *et al.*, 1999; Nachury und Weis, 1999). Allerdings wird für den Aufbau und die Aufrechterhaltung des RanGTP/GDP-Gradienten entlang der Kernmembran Energie benötigt. Dieser Gradient wird von Karyopherinen über eine schwach konservierte Bindedomäne detektiert, beeinflusst deren Substrataffinität und ermöglicht somit die Direktionalität der Transportrichtung. Durch das Protein Ran (Gsp1p in *S. cerevisiae*), das zu der Familie der Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Proteine gehört, wird diese Direktionalität moduliert.

Im Zellkern liegt Ran hauptsächlich mit GTP assoziiert vor, wohingegen im Zytoplasma vor allem die Guanosindiphosphat (GDP)-gebundene Form vorkommt (Abb. 2). Die niedrige Konzentration von RanGTP im Zytoplasma ermöglicht die Bildung von Rezeptor-Substrat-Komplexen, welche nach dem Import in den Zellkern, der eine hohe Konzentration von RanGTP aufweist, dissoziieren. Bei Exportrezeptoren ist eine Interaktion mit RanGTP für die Substratbindung essentiell. Die Dissoziation der aus Exportrezeptor, Substrat und RanGTP bestehenden Komplexe wird im Zytoplasma durch die Hydrolyse von RanGTP in RanGDP und einen Phosphatrest initiiert (Nakielny und Dreyfuss, 1998; Macara, 2001; Fried und Kutay, 2003).

Der durch den Ran-Gradient hervorgerufene Konzentrationsunterschied von RanGTP und RanGDP basiert auf einer asymmetrischen Verteilung spezifischer Regulatoren (Gorlich *et al.*, 1997; Ribbeck *et al.*, 1999; Kutay *et al.*, 2000). Dies wird durch eine Stimulation der GTPase-Aktivität von Ran durch zum einen das zytoplasmatisch lokalisierte RanGTPase aktivierende Protein (*Ran GTPase-activating protein*, RanGAP, Rna1p in *S. cerevisiae*) und zum anderen mit Unterstützung der Ran-Bindeproteine RanBP1 (Yrb1p in *S. cerevisiae*) und RanBP2 (Yrb2p in *S. cerevisiae*) hervorgerufen (Abb. 2). Daraufhin erfolgt die Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch die Menge an RanGDP erhöht wird. Der im Zellkern lokalisierte, Chromatin-assoziierte Ran-spezifische Guanin-Austauschfaktor (*Ran guanine nucleotide exchange factor*, RanGEF, Rcc1p/Prp20p in *S. cerevisiae*) katalysiert den Austausch von Ran-gebundenem GDP durch GTP und bestimmt somit die hohe RanGTP- und niedrige RanGDP-Konzentration im Zellkern (Mattaj und Englmeier,

1998; Gorlich und Kutay, 1999; Kaffman und O'Shea, 1999; Conti und Izaurrealde, 2001; Kunzler und Hurt, 2001; Bischoff *et al.*, 2002).

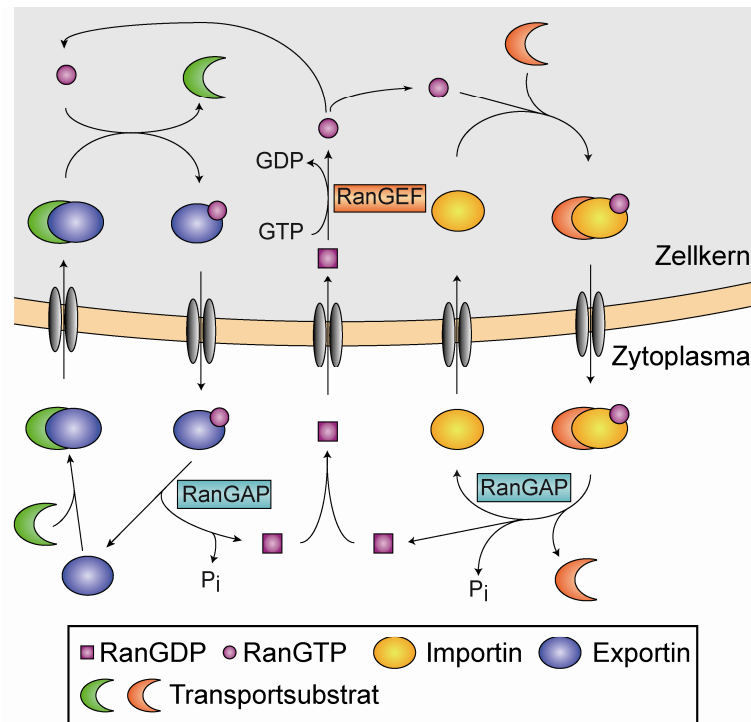


Abbildung 2: Schematische Darstellung des nukleären Imports und Exports durch den NPC.

Die asymmetrische Verteilung der spezifischen Regulatoren RanGAP, RanBP1, RanBP2 und RanGEF der GTPase Ran führt einerseits zur Entstehung eines RanGTP/GDP-Gradienten über der Zellkernmembran. Andererseits wird die Richtung des Transports festgelegt. Das in den Zellkern zu transportierende Substrat assoziiert im Zytoplasma mit dem Importin. Im Zellkern dissoziiert das Substrat vom Importin durch die Bindung von RanGTP an das Importin. Nach dem Rücktransport des Importin-RanGTP-Komplexes in das Zytoplasma wird die Hydrolyse von RanGTP durch RanGAP und RanBP1 stimuliert. Substrate, die in das Zytoplasma transportiert werden, assoziieren mit Exportinen und RanGTP im Zellkern. Nach der Translokation des trimeren Substrat-Exportin-RanGTP-Komplexes durch den NPC dissoziiert das Substrat durch die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP und anorganisches Phosphat vom Exportin.

Dieser Ran-Gradient hat eine große Bedeutung für den regulierten Ablauf von nukleozytoplasmatischen Transportprozessen. Im Zytoplasma lokalisierte Transportsubstrate mit einem NLS binden nur in Gegenwart von RanGDP an ihren jeweiligen Importrezeptor (Abb. 2). Dieser vermittelt die Interaktionen mit einem oder mehreren Nukleoporinen, so dass der importkompetente Proteinkomplex schließlich in den Zellkern transportiert wird. Nach dem nukleären Austausch von GDP zu GTP erfolgt eine Konformationsänderung von Ran. Dies führt zur Dissoziation des Transportsubstrates vom Importrezeptor. Im Zellkern binden NES-enthaltene Transportsubstrate in Gegenwart von RanGTP an ihren jeweiligen Exportrezeptor. Der exportkompetente Proteinkomplex wird anschließend durch den NPC in das Zytoplasma transportiert, wobei der Exportrezeptor die Interaktionen mit den NPC-Komponenten vermittelt. Im Zytoplasma kommt es durch die RanGAP-vermittelte Hydrolyse von GTP zu GDP zu einer erneuten Konformationsänderung von

Ran, die in einer Dissoziation des Exportkomplexes resultiert (Rout *et al.*, 2000; Zenklusen und Stutz, 2001; Fahrenkrog und Aebi, 2003).

1.5 Der Aufbau, die Biogenese und der nukleäre Export von Ribosomen

Sowohl eukaryontische als auch prokaryontische Ribosomen bestehen aus zwei verschieden großen Untereinheiten. Diese Komplexe sind aus zahlreichen Proteinen sowie ribosomaler RNA (rRNA) zusammengesetzt. Obwohl die Ribosomen der verschiedenen Organismen in ihrer Größe, der Anzahl sowie der Proteinzusammensetzung bzw. der rRNA's variieren, lassen sich strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten erkennen (Ramakrishnan und Moore, 2001; Doudna und Rath, 2002; Schuwirth *et al.*, 2005). Das 80S-Ribosom von Eukaryonten besteht aus einer kleinen (40S) und einer großen ribosomalen Untereinheit (60S). Die 40S-Untereinheit besteht aus der 18S rRNA sowie etwa 35 ribosomalen Proteinen; die 60S-Untereinheit aus der 5S, der 5,8S und der 28S rRNA zusammen mit etwa 50 ribosomalen Proteinen.

Die Biogenese der ribosomalen Untereinheiten beginnt im Zellkernkörperchen (Abb. 3). Anschließend folgen zahlreiche Prozessierungen im Zellkern sowie im Zytoplasma, bis die beiden funktionsfähigen ribosomalen Untereinheiten entstanden sind. Von der rDNA wird durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase I ein Vorläufermolekül, die 35S rRNA, und durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase III die 5S rRNA synthetisiert. Das Genom der rDNA besteht aus mehreren Abschnitten, welche sich aus tandemartig angeordneten Genkopien zusammensetzen und auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sein können. Nach der Synthese assemblieren zahlreiche ribosomale und nicht-ribosomale Proteine an die beiden prä-rRNA's, wodurch sich das prä-90S-Ribosom bildet. Das Zerschneiden der 35S rRNA-Region zwischen der 18S und der 5,8S rRNA führt zu der Trennung des prä-90S-Ribosoms in ein prä-66S- sowie ein prä-44S-Ribosom, den Vorläuferpartikeln der reifen ribosomalen 60S- bzw. 40S-Untereinheit.

Bislang wurden etwa 150 nicht-ribosomale Proteine identifiziert, die an der ribosomalen Biogenese und/oder Prozessierung beteiligt sind, wie RNA-modifizierende Proteine, RNA-Helikasen oder Endo- bzw. Exonukleasen (Kressler *et al.*, 1999; Venema und Tollervey, 1999; Lafontaine und Tollervey, 2001; Zemp und Kutay, 2007). Diese Proteine werden durch Importine nach ihrer Translation im Zytoplasma in den Zellkern bzw. in das Zellkernkörperchen transportiert (Jakel und Gorlich, 1998; Palmeri und Malim, 1999;

Truant und Cullen, 1999). Des Weiteren wurden in den letzten Jahren zahlreiche Proteine in *S. cerevisiae* charakterisiert, die eine Funktion beim intranukleären Transport (Milkereit *et al.*, 2001; Nissan *et al.*, 2002; Milkereit *et al.*, 2003a), bei der nukleären Prozessierung (Gadal *et al.*, 2001a; Lafontaine und Tollervey, 2001; Gadal *et al.*, 2002; Milkereit *et al.*, 2003b; Ferreira-Cerca *et al.*, 2005; Bassler *et al.*, 2006; Ferreira-Cerca *et al.*, 2007) oder beim Export der prä-ribosomalen Untereinheiten in das Zytoplasma beteiligt sind (Tschochner und Hurt, 2003).

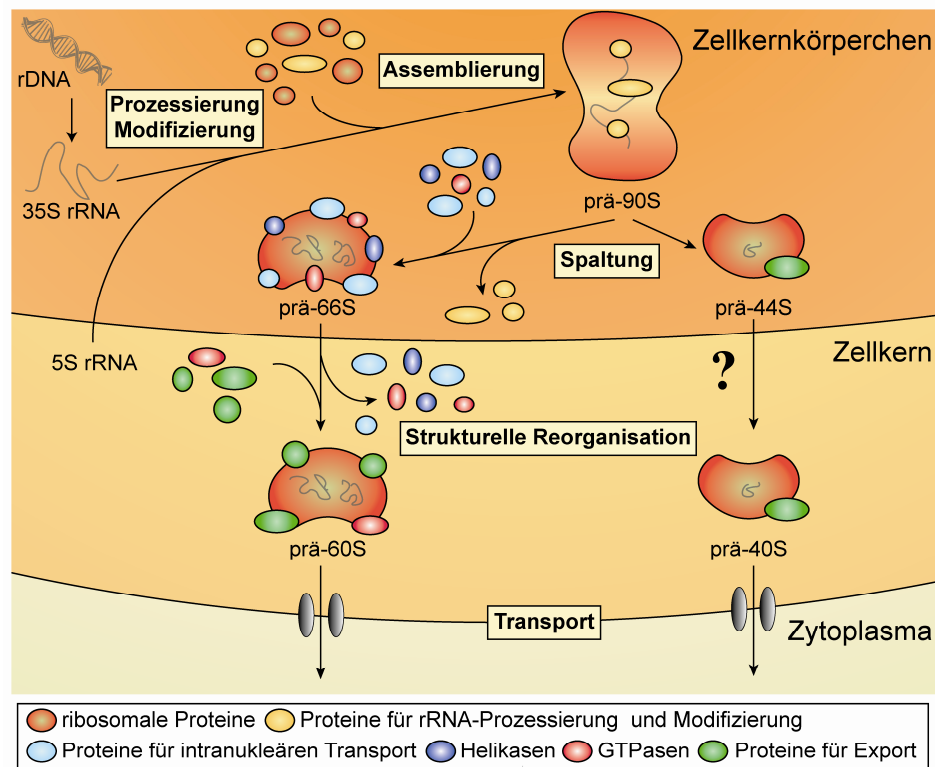


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ribosomenbiogenese im Zellkernkörperchen und im Zellkern.

Die initialen Schritte der Ribosomenbiogenese erfolgen nach der Transkription der 35S rRNA im Zellkernkörperchen, bei dem zahlreiche ribosomale und nicht-ribosomale Proteine, die Prozessierungs- und/oder Modifizierungsfunktionen besitzen, mit der 35S rRNA assoziieren und zu einem prä-90S-Ribosom assemblieren. Die prä-rRNA's unterliegen zahlreichen Modifizierungen, wie Methylierungen der 2'-Hydroxylgruppen und Pseudouridinylierungen. Im Anschluß an die Spaltung des prä-90S-Ribosom in ein prä-66S- und ein prä-44S-Ribosom werden diese vermutlich über Diffusion in den Zellkern transportiert. Der Export der ribosomalen Untereinheiten erfordert zahlreiche strukturelle Umgestaltungen. Zum einen dissoziieren zahlreiche prä-ribosomal assoziierte Proteine, wie Prozessierungs- und Assemblierungsfaktoren, ab. Zum anderen werden Proteine, die für den Transport in das Zytoplasma benötigt werden, an die ribosomalen Untereinheiten rekrutiert. Die verschiedenen Proteinfamilien, die mit den prä-Partikel assoziieren, sind durch verschiedene Farben dargestellt (modifiziert nach: Lafontaine und Tollervey, 2001 und Nissan *et al.*, 2002).

Der Export der prä-40S- und der prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma erfolgt getrennt (Warner, 1971). Nach der Biogenese und Prozessierung der prä-60S-Untereinheit wird diese mit Hilfe des Exportins Xpo1p (CRM1 in Mammalia) und dem Adapterprotein Nmd3p (NMD3 in Mammalia) in einem RanGTP-abhängigen Prozess durch den NPC in

das Zytoplasma transportiert (Hurt *et al.*, 1999; Moy und Silver, 1999; Stage-Zimmermann *et al.*, 2000; Gadal *et al.*, 2001b; Gleizes *et al.*, 2001). Xpo1p bindet an ein kurzes, Leuzin-reiches NES des an die prä-60S-Untereinheit gebundenen Nmd3p (Ho *et al.*, 2000; Gadal *et al.*, 2001b; Kutay und Guttinger, 2005; Hedges *et al.*, 2006; West *et al.*, 2007). Zusätzlich vermittelt das hoch-konservierte Exportrezeptorheterodimer Mtr2p-Mex67p (TAP-p15 in Mammalia), das ebenso eine essentielle Rolle während des mRNA-Exports besitzt, durch die Interaktion von Mex67p mit der rRNA den Transport der prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma (Bassler *et al.*, 2001; Nissan *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2007). Aufgrund der fehlenden Interaktion von Mtr2p mit RanGTP-assoziierten Exportinen wird vermutlich ein anderer Mechanismus für die Interaktion mit Nukleoporinen verwendet (Stutz und Izaurralde, 2003).

Im Zytoplasma erfolgen weitere Prozessierungen beider ribosomaler Untereinheiten. Diese umfassen die Assoziation oder Dissoziation von mehreren Proteinen, um für die Translation funktionsfähige 40S- bzw. 60S-Untereinheiten zu erhalten (Abb. 4). Die dissoziierten Proteine werden in den Zellkern re-importiert, wo sie erneut für die Ribosomenbiogenese und/oder den Export zur Verfügung stehen. Im Zytoplasma dissoziiert dann das Heterodimer Mtr2p-Mex67p von dem prä-60S-Ribosom sowie Xpo1p von der prä-40S- und der prä-60S-Untereinheit (Rouquette *et al.*, 2005). Die Ablösung des Xpo1p-abhängigen Exportadapterproteins Nmd3p erfordert die GTPase Lsg1p (Nissan *et al.*, 2002; Kallstrom *et al.*, 2003; Hedges *et al.*, 2005). Während der Dissoziation von Nmd3p wird gleichzeitig das zytoplasmatisch lokalisierte Rpl10p an die prä-60S-Untereinheit rekrutiert (Karl *et al.*, 1999; Gadal *et al.*, 2001b). Dafür wird zusätzlich das an Rpl10p gebundene Protein Sgt1p/Qsr1p benötigt, welches die Aufgabe eines Chaperons übernimmt (Eisinger *et al.*, 1997; West *et al.*, 2005). Die Interaktion von Rpl10p mit der prä-60S-Untereinheit ist für den Translationsstart essentiell (Eisinger *et al.*, 1997b; Dick und Trumpower, 1998).

Diese späten Schritte in der Prozessierung repräsentieren vermutlich nur einen Teil der zahlreichen im Zytoplasma ablaufenden Prozesse. Beispielsweise ist die Ablösung von Tif6p (eIF6) vor dem Translationsstart für die Assoziation der 40S- und 60S-Untereinheit notwendig (Si und Maitra, 1999; Nissan *et al.*, 2004). Zusätzlich besitzt Tif6p eine Funktion in der Ribosomenbiogenese der prä-60S-Untereinheit, da es in der Reifung zur 25S und 5,8S rRNA aus der prä-rRNA beiträgt (Basu *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2003). Die Dissoziation von Tif6p erfordert sowohl die GTPase-Aktivität von Efl1p (Senger *et al.*, 2001), als auch die Beteiligung von Sdo1p über die Rekrutierung von Efl1p (Menne *et al.*,

2007). Das Protein Arx1p, welches ein Heterodimer mit Alb1p bildet (Hung und Johnson, 2006; Lebreton *et al.*, 2006), wurde als ein weiterer Exportfaktor, der im Zytoplasma von der prä-60S-Untereinheit dissoziiert, identifiziert (Bassler *et al.*, 2001; Bradatsch *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008). Die Dissoziation von Arx1p und Alb1p sowie der Re-Import beider Proteine erfordert zum einen die Aktivität des Zinkfingerproteins Rei1p und zum anderen vermutlich Jjj1p sowie die ATPase-Aktivität von Ssa1p (Demoinet *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2007). Allerdings sind der zeitliche Ablauf und die Reihenfolge der stattfindenden Prozessierungen weitestgehend unverstanden.

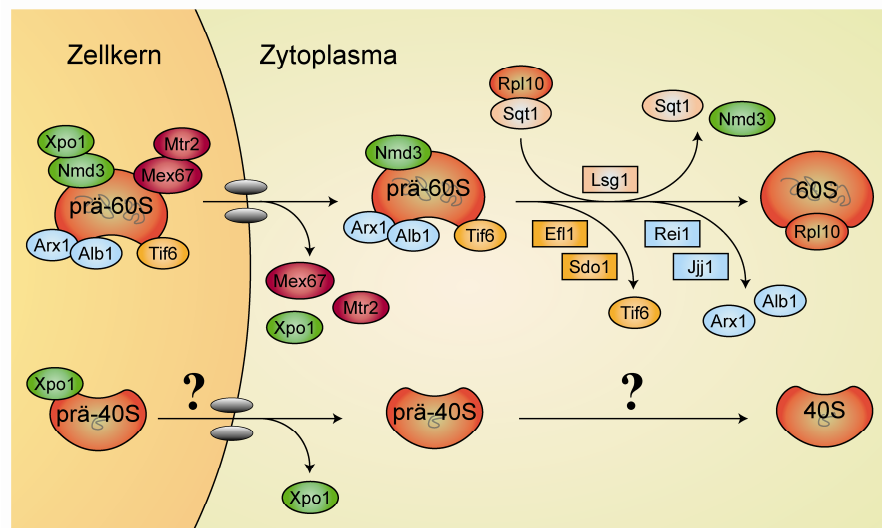


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Exports und der zytoplasmatischen Prozessierungen der prä-ribosomalen Untereinheiten.

Der Transport beider ribosomaler Untereinheiten in das Zytoplasma ist von der GTPase Ran sowie dem Exportin Xpo1p abhängig. Zusätzlich zu Xpo1p, das mit Nmd3p assoziiert, sind die Heterodimere Mtr2p-Mex67p und Arx1-Alb1p beim Export der prä-60S-Untereinheit notwendig. Nach dem Transport unterliegt die prä-60S-Untereinheit weiteren strukturellen Veränderungen und Modifizierungen, wie die Dissoziation von Xpo1p, Mtr2p und Mex67p. Die Ablösung von Nmd3p benötigt die GTPase Lsg1p und ist gleichzeitig mit der Assoziation von Rpl10p an die prä-60S-Untereinheit gekoppelt. Dabei vermittelt die GTP-Hydrolyse durch Lsg1p die Dissoziation von Nmd3p und des Rpl10p-Chaperons Sqt1p. Durch Rei1p und dem J-Protein Jjj1p dissoziiert das Heterodimer Arx1-Alb1p von der prä-60S-Untereinheit. Das Recycling von Tif6p wird durch die GTPase-Aktivität von Efl1p stimuliert. Dabei wird Efl1p durch Sdo1p an das prä-60S-Ribosom rekrutiert (modifiziert nach: Zemp und Kutay, 2007)

Über den Transport der prä-40S-Untereinheit ist im Vergleich zum Export der prä-60S-Untereinheit bislang wenig bekannt. Eine Gemeinsamkeit beim Transport ist die Beteiligung des Exportrezeptors Xpo1p in einem RanGTP-abhängigen Prozess (Moy und Silver, 1999; Moy und Silver, 2002; Ferreira-Cerca *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde das Protein Ltv1p identifiziert, das eine Funktion beim prä-40S-Export besitzt (Schafer *et al.*, 2003; Seiser *et al.*, 2006). Da Ltv1p nicht essentiell ist, ist dieses Protein vermutlich nicht der einzige Adapter für Xpo1p. Allerdings ist, neben Xpo1p und Ltv1p, kein weiteres Protein bekannt, das direkt am Export der prä-40S-Untereinheit beteiligt ist. Es ist

auszuschließen, dass ein einzelner Mechanismus ausreicht, um das prä-40S-Ribosom durch den NPC zu transportieren. Weiterhin ist unklar, ob zusätzlich ATPasen bzw. GTPasen benötigt werden, um die notwendige Energie für Konformationsänderungen oder die Translokation der ribosomalen Untereinheiten durch den NPC zur Verfügung zu stellen. Im Zytoplasma folgen weitere Prozessierungsschritte der 20S rRNA. Dazu zählen das Zerschneiden dieser zur 18S rRNA mit Hilfe von Nob1p (Fatica *et al.*, 2003; Schafer *et al.*, 2003; Fatica *et al.*, 2004) oder nicht-essentielle Dimethylierungen durch Dim1p and Dim2p (Lafontaine *et al.*, 1995; Lafontaine *et al.*, 1998; Vanrobays *et al.*, 2004). Des Weiteren erfolgen Konformationsänderungen, damit die 40S-Untereinheit translationell aktiv sein kann (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005). Die Modifizierungen und Prozessierungen der prä-40S- und prä-60S-Untereinheit dienen als Kontrollpunkt für die Qualitätskontrolle. Somit erfolgt zum einen die Regulation der Reifung zur ribosomalen Untereinheit ebenso auf der Ebene der Struktur und der Proteinzusammensetzung. Zum anderen wird dadurch eine vorzeitige nukleäre und zytoplasmatische Assemblierung beider ribosomalen Untereinheiten während der Biogenese verhindert.

1.6 Der nukleäre Export der mRNA

Der mRNA-Export wird über zahlreiche hoch-konservierte Proteine vermittelt, welche die einzelnen Schritte der Biogenese, Prozessierungen, Modifizierungen sowie den Transport miteinander koppeln. Dieser ist im Gegensatz zum Export von Proteinen bis auf wenige Ausnahmen nicht von der GTPase Ran abhängig (Neville und Rosbash, 1999; Clouse *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2004; Aguilera, 2005a; Aguilera, 2005b; Bentley, 2005; Reed und Cheng, 2005). Die Assemblierung von Proteinen an die mRNA bis hin zur Fertigstellung der exportkompetenten mRNA, sowie die Unterscheidung der zu exportierenden mRNP's von unfertigen, aber auch spezifischen mRNA's, die im Zellkern zur Lagerung oder Abbau zurückgehalten werden, ist ein hoch-komplexer Prozess und bis heute nur teilweise verstanden (Prasanth *et al.*, 2005). Die Interaktion der zahlreichen Proteine, die an der Prozessierung und der Verpackung des exportkompetenten mRNP's involviert sind, erfolgt bereits ko-transkriptionell (Legrain und Rosbash, 1989).

Während der Transkriptionsinitiation können Proteine spezifisch an Konsensussequenzen der prä-mRNA binden und mit den Initiationsfaktoren oder zu einem späteren Zeitpunkt ebenso mit ribosomalen Untereinheiten wechselwirken (Ostareck *et al.*, 2001). Des Weiteren vermittelt die hyperphosphorylierte, carboxyterminale Domäne der DNA-

abhängigen RNA-Polymerase II die Bindung von sowohl mRNA-prozessierenden Proteinen als auch Proteinen zum Transport des mRNP's in das Zytoplasma an die prä-mRNA (Proudfoot *et al.*, 2002). Der mRNA-Export ist von der 5'- sowie der 3'-Prozessierung der prä-mRNA (Krecic und Swanson, 1999; Wahle und Ruegsegger, 1999; Zhao *et al.*, 1999; Hammell *et al.*, 2002; Hector *et al.*, 2002; Brune *et al.*, 2005) und dem Spleißprozess bei intronhaltiger mRNA abhängig (Legrain und Rosbash, 1989; Luo und Reed, 1999).

Die Exportfaktoren werden über verschiedene Mechanismen an das reifende mRNP rekrutiert. Diese Proteine variieren innerhalb der Organismen, da z.B. in *S. cerevisiae* etwa 95% der Gene keine Intronsequenzen besitzen, im Vergleich zu 5% der humanen Gene (Goffeau *et al.*, 1996; Venter *et al.*, 2001). Daher erfolgt eine Rekrutierung einzelner Proteine überwiegend über die Transkriptions- bzw. Prozessierungsmaschinerie (Abruzzi *et al.*, 2004; Abruzzi *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae* wird das entstehende Transkript durch den an der Transkriptionselongation beteiligten THO/TREX-Komplex, der mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II assoziiert, zu einem prä-mRNP assembliert (Strasser *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002; Rondon *et al.*, 2003; Kohler und Hurt, 2007; Garcia-Rubio *et al.*, 2008).

Der TREX-Komplex besteht aus den beiden Proteinen Sub2p (UAP56 in Mammalia) und Yra1p (ALY/REF in Mammalia), wobei der THO-Komplex aus den Proteinen Tho2p, Hrp1p, Mft1p und Thp2p zusammengesetzt ist. Die RNA-Helikase Sub2p wird durch den THO-Komplex an die prä-mRNA rekrutiert, wodurch anschließend die direkte Bindung von Yra1p an die prä-mRNA ermöglicht wird. Zusätzlich wird durch die Interaktion des THO/TREX-Komplexes zum einen über Sub2p zum anderen über Yra1p und Mex67p-Mtr2p mit dem TREX2-Komplex (Sus1p, Sac3p und Thp1p) der Export der mRNP's vermittelt (Fischer *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2003; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004; Gonzalez-Aguilera *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist Sus1p ein Bestandteil des an der Transkriptionsinitiation beteiligten SAGA-Komplexes, der an Regulation der Transkription beteiligt ist.

Diese frühzeitige Rekrutierung erlaubt ein hohes Maß an Kontrolle und Regulation (Reed und Hurt, 2002; Stutz und Izaurralde, 2003). Nach der ko-transkriptionellen Assoziation von zusätzlichen prä-mRNA-Faktoren, wie mRNA-bindenden Proteinen oder dem kappenbindenden Komplex, wird das Heterodimer Mex67p-Mtr2p über Yra1p an das mRNP rekrutiert (Kadowaki *et al.*, 1994; Portman *et al.*, 1997; Segref *et al.*, 1997; Santos-Rosa *et al.*, 1998; Stutz *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2001). Dieses Exportrezeptor-

heterodimer besitzt neben dem Transport der prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma beim mRNA-Export eine zentrale Rolle, da es die Interaktionen zwischen dem export-kompetenten mRNP und dem NPC vermittelt (Katahira *et al.*, 1999; Strasser *et al.*, 2000; Katahira *et al.*, 2002; Wiegand *et al.*, 2002; Dieppois *et al.*, 2006). Der Translokationsprozess des mRNP's wird durch die schwache Interaktion zwischen Mex67p-Mtr2p und den FG-Domänen spezifischer Nukleoporine vermittelt (Braun *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2004).

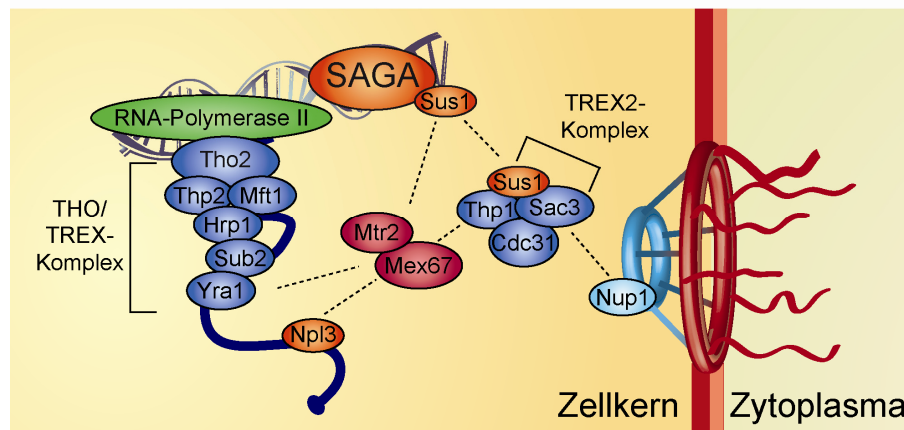


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Transkriptions-gekoppelten mRNA-Exports.

Die Aktivierung der zu transkribierenden Gene erfolgt meist in räumlicher Nähe zur Zellkernmembran. Während der Initiation assoziiert der SAGA-Komplex als Teil des großen Prä-Initiationskomplexes an Promotorbereiche der zu transkribierenden Gene. Durch die Interaktion von SAGA und dem mit dem NPC-assoziierten TREX2-Komplex (Sac3p, Thp1p, Sus1p and Cdc31p) erfolgt die Anbindung der aktivierten Gene an die Zellkernmembran, da Sac3p direkt an das Nukleoporin Nup1p bindet. Mit Hilfe des THO/TREX-Komplexes, der früh an das entstehende Transkript rekrutiert wird, wird dieses zu einem export-kompetenten mRNP assembliert. Durch die Interaktion des Exportrezeptorheterodimers Mex67p-Mtr2p mit den mRNA-assoziierten Adapterproteinen Yra1p oder Npl3p erfolgt zusätzlich die Assoziation des mRNP's mit dem NPC, da dieses mit Sus1p, was sowohl eine funktionelle Komponente des SAGA-Komplexes sowie dem TREX2-Komplexes ist, interagiert (modifiziert nach: Kohler und Hurt, 2007).

Zusätzlich unterstützen weitere Proteine den Exportprozess (Nakielny und Dreyfuss, 1997; Stutz und Rosbash, 1998; Strasser und Hurt, 1999; Bachi *et al.*, 2000; Gama-Carvalho und Carmo-Fonseca, 2001; Zenklusen und Stutz, 2001; Zenklusen *et al.*, 2001; Gama-Carvalho *et al.*, 2006). Dazu gehören Vertreter aus der Familie der mRNA-bindenden Proteine, die aus zahlreichen Mitgliedern besteht. Einige dieser Proteine besitzen nicht nur wichtige Funktionen während des nukleären Exports, sondern ebenso bei der Prozessierung der mRNA, da sie sowohl mRNA-Protein- als auch Protein-Protein-Interaktionen modulieren. In *S. cerevisiae* bindet beispielsweise das Protein Hrp1p nahe des 3'-Endes der mRNA und vermittelt als ein Bestandteil des *Cleavage Factors I* die 3'-Prozessierung der mRNA (Kessler *et al.*, 1997; Minvielle-Sebastia *et al.*, 1998; Valentini *et al.*, 1999; Xu und Henry, 2004). Durch die Bindung von Nab2p an den poly(A)-Schwanz der mRNA wird deren

Länge kontrolliert (Lee und Aitchison, 1999; Green *et al.*, 2002; Hector *et al.*, 2002; Suntharalingam *et al.*, 2004; Viphakone *et al.*, 2008).

Des Weiteren sind die pendelnden, mRNA-bindenden Proteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p, die der Familie der Serin-Arginin (SR)-Proteine angehören, von zentraler Bedeutung beim Transport der mRNA in das Zytoplasma (siehe 1.9) (Flach *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996; Krebber *et al.*, 1999; Lei *et al.*, 2001; Windgassen und Krebber, 2003; Hacker und Krebber, 2004; Windgassen *et al.*, 2004). Während des Translokationsprozesses durch den NPC erfolgen mannigfaltige Umgestaltungen der mRNP's. Beispielsweise wird die, auf der zytoplasmatischen Seite des NPC's stattfindende Ablösung von Mex67p-Mtr2p durch die DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p katalysiert, welche frühzeitig an die prä-mRNA während der Transkription rekrutiert wird (siehe 1.10) (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Hodge *et al.*, 1999; Rollenhagen *et al.*, 2004; Lund und Guthrie, 2005).

Die Bewegung der mRNP's innerhalb des Zellkerns erfolgt in Bereichen, in denen kein Chromatin vorhanden ist, voraussichtlich über Diffusion (Zachar *et al.*, 1993; Politz *et al.*, 1999; Shav-Tal *et al.*, 2004; Politz *et al.*, 2006). Zusätzlich werden für die Transkriptionsaktivierung zahlreiche Gene durch ihre Bewegung aus dem Inneren des Zellkerns an die nukleäre Peripherie transportiert, wo sie physikalisch mit Komponenten des NPC's interagieren (Brickner und Walter, 2004; Casolari *et al.*, 2005; Menon *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2006). Für den Translokationsprozess der mRNP's durch den NPC sind Umstrukturierungen, Proteinumlagerungen sowie teilweise Entfaltungen der Sekundärstrukturen erforderlich. Sowohl der Kontakt mit Proteinen des NPC's als auch der Eintritt des mRNP's erfolgt vermutlich über dessen 5'-Ende, was auf eine Polarität sowie richtungsorientierten Durchtritt hindeutet (Daneholt, 2001).

Innerhalb des NPC's ist es aufgrund der Größe des mRNP's unwahrscheinlich, dass die Durchquerung im Gegensatz zu dem Karyopherin-vermittelten Transport über Diffusion erfolgt. Daher ist ein Mechanismus vorstellbar, bei dem das mRNP über einen energie-abhängigen Prozess mit Hilfe einer ATP-Hydrolyse durch den NPC transportiert wird. Während einige mRNA-bindende Proteine bereits vor dem Export vom mRNP dissoziieren, transportieren andere Vertreter dieser Proteinfamilie das mRNP in das Zytoplasma. Dabei unterliegen diese Proteine einem gewissen Zyklus, in dem sie die mRNA in das Zytoplasma begleiten, von ihr dissoziieren und durch Importine wieder in den Zellkern transportiert werden. Die meisten der pendelnden mRNA-bindenden Proteine lösen sich direkt, nachdem sie das Zytoplasma erreicht haben, von dem mRNP. Jedoch verbleiben einige dieser Proteine bis zum Beginn oder auch während der Translation an der

mRNA assoziiert (Windgassen *et al.*, 2004). Zudem weisen zahlreiche dieser mRNA-bindenden Proteine, die zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln, regulatorische Funktionen bei der Translation auf (Dreyfuss *et al.*, 2002).

1.7 Die Qualitätskontrolle und der Abbau der mRNA

Routinemäßig entstehen während der Genexpression in eukaryontischen Zellen Fehler, die entweder während der Transkription und/oder der Prozessierung der prä-mRNA hervorgerufen werden können oder direkt durch das Genom verschlüsselt sind. Schätzungsweise 30-35% aller Mutationen führen zu einem verfrühten Stopp-Kodon (*premature termination codon*, PTC). Diese Fehler können sich zu erworbenen oder vererbten Krankheiten manifestieren. Infolgedessen haben Zellen während der Evolution Mechanismen entwickelt, die die Qualität der mRNA kontrollieren, um so mögliche Schäden zu minimieren. Die unterschiedlichen Arten der Qualitätskontrolle, die während der mRNA-Biogenese bis hin zur Translation ablaufen, gewährleisten die Aufrechterhaltung der korrekten Genexpression (Dimaano und Ullman, 2004; Parker und Song, 2004; Vinciguerra und Stutz, 2004; Conti und Izaurralde, 2005; Fasken und Corbett, 2005; Maquat, 2005; Moore, 2005; Saguez *et al.*, 2005; Behm-Ansmant und Izaurralde, 2006; Houseley *et al.*, 2006; Behm-Ansmant *et al.*, 2007; Isken und Maquat, 2007; Isken und Maquat, 2008). Bei diesen Kontrollmechanismen wird die Translation der mRNA's, die eine anormale Proteinbiosynthese zur Folge hätte, verhindert und der Abbau dieser mRNA's eingeleitet.

Der mRNA-Transport in das Zytoplasma wird, obwohl zahlreiche Exportfaktoren schon frühzeitig während der Transkription an die prä-mRNA rekrutiert werden, bis zum Abschluss der Reifungsprozesse unterbunden, da einige Prozessierungsfaktoren eine inhibierende Wirkung auf den mRNA-Export aufweisen (Milligan *et al.*, 2005; Saguez *et al.*, 2005). Ein nukleäres Kontrollsystem in *S. cerevisiae* erfolgt zum einen während der Transkription. Zum anderen wird mit Hilfe der am NPC lokalisierten Proteine Mlp1p und Mlp2p (TPR-Proteine in Mammalia), die mit dem an die mRNA-gebundenen Nab2p interagieren, der Export fehlerhafter mRNA's verhindert. Diese werden in einem Abbauprozess durch die nukleäre 3'-5'-Exoribonuklease degradiert (Wilkinson und Shyu, 2002; Green *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2003; Casolari und Silver, 2004; Galy *et al.*, 2004; Vinciguerra und Stutz, 2004; Dunn *et al.*, 2005; Palancade *et al.*, 2005; Vinciguerra *et al.*, 2005; Fasken *et al.*, 2008; Grant *et al.*, 2008; Shyu *et al.*, 2008).

Ein weiterer, in zahlreichen Organismen beschriebener Mechanismus zum Abbau fehlerhafter mRNA's ist der im Zytoplasma stattfindende *Nonsense*-vermittelte mRNA-Abbau (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD). Dadurch werden PTC's erkannt, die durch Mutationen im ORF oder durch fehlerhaftes Spleißen und daraus resultierendes Verschieben des Leserahmens entstehen. Die spezifische Erkennung des PTC's erfolgt in höheren Eukaryonten mit Hilfe der Positionsbestimmung des EJC's. Dieser bindet während des Spleißvorganges im Zellkern sequenzunabhängig, etwa 20 Nukleotide stromaufwärts der Exon-Exon-Verknüpfung an die mRNA (Maquat, 2002; Chan *et al.*, 2004; Nott *et al.*, 2004; Isken und Maquat, 2007). Die Degradation über den NMD-Prozess wird nicht nur bei fehlerhaften mRNA's eingeleitet, sondern reguliert ebenso die Expression von etwa 10-20% der korrekten Transkripte (Lelivelt und Culbertson, 1999; He *et al.*, 2003; Hillman *et al.*, 2004; Mendell *et al.*, 2004; Lejeune und Maquat, 2005). Schätzungen zufolge könnten etwa 75% aller alternativ gespleißten Transkripte theoretisch Substrate für den NMD darstellen.

Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten werden in *S. cerevisiae* mRNA's mit einem fehlerhaften (*faux*) 3'-UTR dem NMD zugeführt. Es wird ein möglicher Mechanismus postuliert, bei dem der ungewöhnlich lange Abstand zwischen dem PTC und des am poly(A)-Schwanz gebundenen Proteins Pab1p (PABP in Mammalia) zum Abbau dieser mRNA's führt (Amrani *et al.*, 2004). Dieser Mechanismus ist daher teilweise unabhängig vom Spleißprozess. Die Rolle des EJC's wird in *S. cerevisiae* von Hrp1p übernommen, das sowohl an dem Polyadenylierungssignal im 3'-UTR, als auch an spezifischen DSE-Regionen (*downstream sequence elements*) in der kodierenden Region der mRNA bindet (Gonzalez *et al.*, 2000). Der EJC wird zusammen mit der mRNA in das Zytoplasma exportiert, wo er bis zum Translationsbeginn mit dem mRNP assoziiert und zusätzliche Informationen übermittelt, die eine spätere Qualitätskontrolle der mRNA während der initialen Translationsrunde, der Pionierrunde, ermöglichen.

Die Pionierrunde erfolgt in Gegenwart der kappenbindenden Proteine Cbp20p und Cbp80p sowie Hrp1p in *S. cerevisiae*, in der die EJC's bzw. in *S. cerevisiae* Hrp1p von der mRNA entfernt werden (Gonzalez *et al.*, 2000; Dostie und Dreyfuss, 2002; Lejeune *et al.*, 2002). Die Erkennung eines PTC's führt zur Rekrutierung von NMD-Faktoren, zur Ausbildung des *Surveillance*-Komplex und letztendlich zur Degradation der mRNA. In *S. cerevisiae* weisen die drei Hauptkomponenten des *Surveillance*-Komplex, Upf1p (UPF1 in Mammalia), Upf2p (UPF2 in Mammalia) und Upf3p (UPF3 und UPF3X in Mammalia), für den NMD-Prozess essentielle und in Eukaryonten hoch-konservierte Funktionen auf

(Hodgkin *et al.*, 1989; Leeds *et al.*, 1991; Cui *et al.*, 1995; He *et al.*, 1997; Page *et al.*, 1999; Serin *et al.*, 2001; Gatfield *et al.*, 2003). Upf3p ist ein überwiegend nukleär lokalisiertes Protein, das zusammen mit dem perinukleär lokalisierten Upf2p über den EJC mit der gespleißten mRNA interagiert (Le Hir *et al.*, 2000; Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). Die zytoplasmatisch lokalisierte RNA-Helikase Upf1p verknüpft die beiden Terminationsfaktoren Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) der Translationsmaschinerie mit den Proteinen Upf2p und Upf3p des *Surveillance*-Komplexes (Czaplinski *et al.*, 1998; Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Mendell *et al.*, 2002).

Unabhängig von dem Mechanismus, mit dem ein PTC erkannt und eine anormale mRNA dem NMD zugeführt wird, leitet eine Verkürzung des poly(A)-Schwanzes durch Deadenylasen den Abbau der mRNA ein (Parker und Song, 2004). Ein möglicher Abbauweg der mRNA wird durch den initialen Deadenylierungsprozess stimuliert und erfolgt über die Entfernung der 5'-Kappe mit Hilfe von Dcp1p (DCP1 in Mammalia) und Dcp2p (DCP2 in Mammalia). Dadurch wird die mRNA für die anschließende Degradation durch die zytoplasmatische 5'-3'-Exonuklease Xrn1p (XRN1 in Mammalia) zugänglich (Muhlrads und Parker, 1994; Cao und Parker, 2003; Mitchell und Tollervey, 2003; Conti und Izaurralde, 2005; Fillman und Lykke-Andersen, 2005). Der Abbau der mRNA's über diesen Mechanismus erfolgt vermutlich in spezialisierten, zytoplasmatisch lokalisierten Kompartimenten, den P-Körperchen (*processing bodies* oder *P-bodies*) (van Dijk *et al.*, 2002; Cougot *et al.*, 2004). Eine weitere Möglichkeit zum Abbau von mRNA's wird nach der Deadenylierung durch zahlreiche 3'-5'-Exonukleasen, die sich zu einem multimeren Proteinkomplex, dem Exosom, assemblieren, sowie dem regulierend wirkenden Ski-Komplex vermittelt (Muhlrads und Parker, 1994; Mitchell und Tollervey, 2003; Parker und Song, 2004). Dieser Ski-vermittelte Mechanismus erfolgt vorrangig beim Abbau von mRNA's, die kein Stopp-Kodon besitzen (*nonstop mRNA decay*).

1.8 Die Translation

Die Translation zählt zu den komplexesten Synthesevorgängen in einer Zelle und umfasst die Umsetzung der in der mRNA-enthaltenen genetischen Information, die für den Aufbau eines Proteins benötigt wird. Dazu kodieren jeweils drei aufeinander folgende Nukleotide der mRNA, auch Kodon oder Basentriplett genannt, für eine Aminosäure. Durch die 64 möglichen Basentriplets ergibt sich der so genannte universelle genetische Code. Der genetische Code ist degeneriert, da einige Aminosäuren durch mehrere Basentriplets

verschlüsselt werden. Ein AUG-Kodon fungiert als Start-Kodon, wohingegen die drei Kodons UAA, UAG und UGA als Stopp-Signale die Termination der Translation einleiten. Die Umsetzung des genetischen Codes in die Aminosäuresequenz wird am Ribosom mit die Hilfe der Aminoacyl-tRNA's (aa-tRNA's) ermöglicht. Dabei erkennt die Anti-Kodonsequenz der aa-tRNA das komplementäre Kodon der mRNA. Bevor die aa-tRNA als Adaptermolekül in der Proteinbiosynthese wirkt, wird durch die Aminoacyl-Transfer-RNA-Synthetase die tRNA mit der spezifischen Aminosäure verknüpft. Die Translation in Eukaryonten erfolgt durch das 80S-Ribosom, indem die wachsende Aminosäurekette schrittweise an die nächste Aminosäure verknüpft wird.

Die Translation wird in vier Phasen unterteilt: Initiation, Elongation, Termination und Recycling. Die Translationsinitiation in Eukaryonten erfordert die geordnete Assemblierung des ribosomalen Präinitiationskomplexes, dem 48S-Komplex (Abb. 6). Zuvor wird der ribosomale 43S-Komplex durch die Interaktion der 40S-Untereinheit mit den Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A und eIF3 gebildet (Dever, 1999; Pestova *et al.*, 2001). Anschließend erfolgt die Bindung des Ternären Komplexes, bestehend aus GTP-gebundenem eIF2 und der Methionin-gebundenen Initiator-tRNA ($\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$), an den ribosomalen 43S-Komplex.

Bei der kappenabhängigen Translationsinitiation interagiert der Proteinkomplex eIF4F, bestehend aus den Initiationsfaktoren eIF4A, eIF4E und eIF4G, mit der 5'-Kappe der mRNA (Abb. 6). Dieser ermöglicht die Entwindung auftretender Sekundärstrukturen im 5'-UTR der mRNA. Zusätzlich vermittelt die ATP-abhängige Helikase-Aktivität von eIF4A die Bindung der 43S-Untereinheit an die mRNA (Gingras *et al.*, 1999). Der entstandene ribosomale 48S-Komplex wandert am 5'-UTR der mRNA entlang, bis er ein Start-Kodon erreicht. Die Erkennung des Start-Kodons durch die $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ führt zur Dissoziation der Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 sowie eIF5 und zur Bindung der großen ribosomalen Untereinheit (60S). Der Translationsstart erfolgt nach dem Prozess des *Subunit Joinings*, bei dem das funktionelle 80S-Ribosom gebildet wird.

Neben der kappenabhängigen Translationsinitiation existiert ein Re-Initiations-mechanismus zur Translationsregulation, in dem kurze stromaufwärts liegende ORF's (*upstream ORF*, uORF) eine wichtige Funktion besitzen (Gaba *et al.*, 2001; Rajkowitsch *et al.*, 2004).

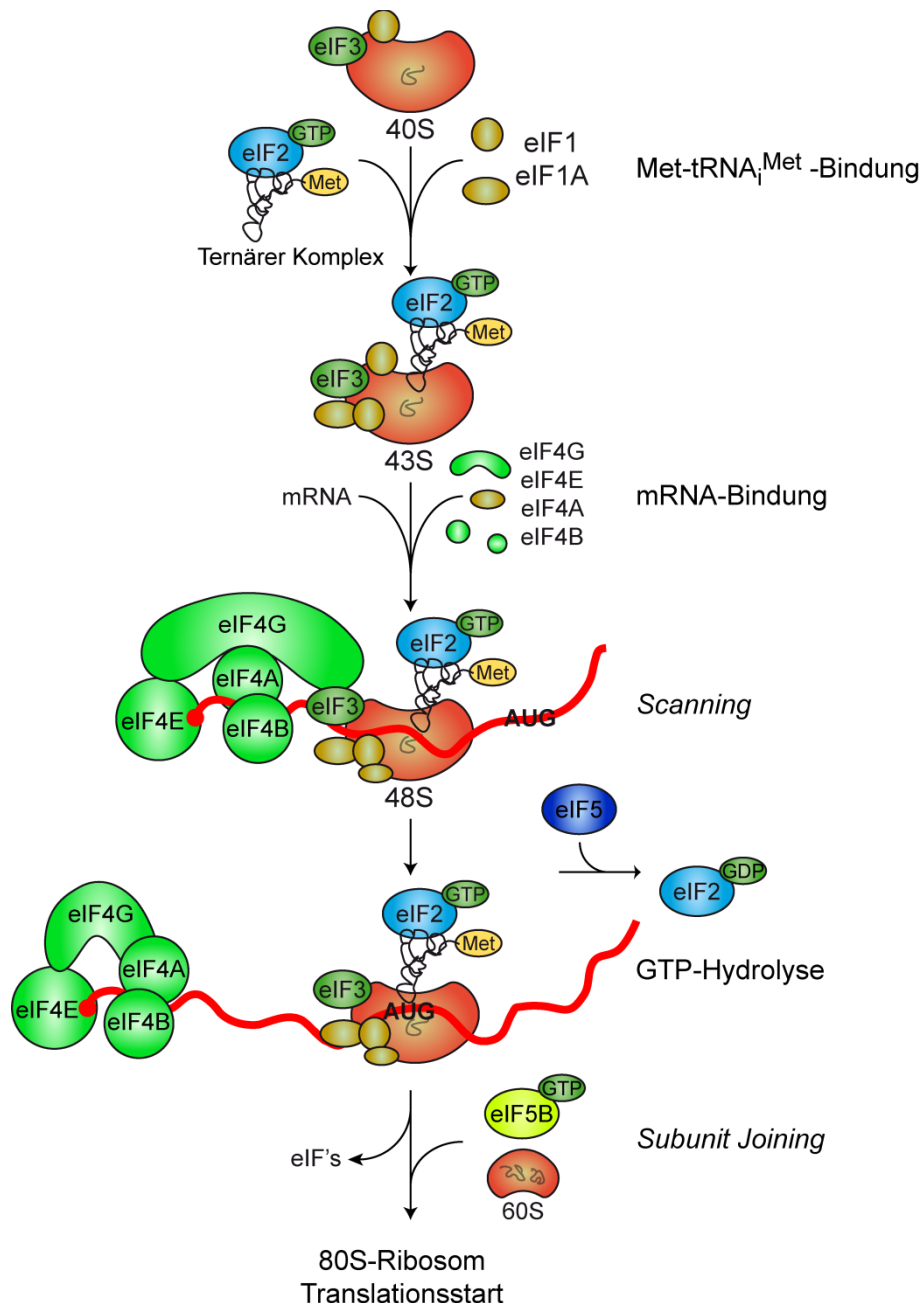


Abbildung 6: Schematische Darstellung der eukaryontischen kappenabhängigen Translationsinitiation.

Der initiale 43S-Komplex wird durch die Assoziation des Ternären Komplexes, der aus der Initiator-tRNA (Met-tRNA_i^{Met}) sowie der aktiven GTP-gebundenen eIF2 besteht, zusammen mit der eIF3-gebundenen 40S-Untereinheit gebildet. Mit Hilfe des an die Kappe gebundenen Proteins eIF4E sowie weiteren Initiationsfaktoren (eIF4A, eIF4B, eIF4G) wird der 43S-Komplex an den 5'-UTR der mRNA für das *Scanning* positioniert. Der gebildete 48S-Komplex scannt die mRNA, bis die Met-tRNA_i^{Met} mit dem initialen AUG-Start-Kodon basenpaart. Die Erkennung des Start-Kodons zusammen mit dem Initiationsfaktor eIF5 stimuliert die Hydrolyse von eIF2GTP zu eIF2GDP. Durch die GTPase eIF5B wird der finale Prozess, das *Subunit Joining*, eingeleitet, bei dem die 60S-Untereinheit mit dem 48S-Komplex assoziiert, die Initiationsfaktoren von der 48S-Untereinheit dissoziieren und das 80S-Ribosom gebildet wird (modifiziert nach: Hershey und Merrick, 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Translationsinitiation wird durch eine spezielle Sekundärstruktur des 5'-UTR's, der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, IRES), vermittelt (Balvay *et al.*, 2007). Diese wird vor allem von viralen

mRNA's, aber auch von einigen zellulären mRNA's genutzt. In diesem zweiten kappenunabhängigen Initiationsmechanismus erfolgt die Rekrutierung, Positionierung und Aktivierung der eukaryontischen Translationsmaschinerie über die IRES. Die Besonderheit dieses Mechanismus besteht darin, dass er teilweise unabhängig von den Translationsinitiationsfaktoren erfolgt und somit eine Möglichkeit bietet, den normalerweise stattfindenden Weg der Translationsinitiation zu umgehen (Kozak, 2001; Dever, 2002; Kozak, 2003). Allerdings besitzen die beiden kappenunabhängigen Mechanismen eine geringere Effizienz (~1-25%) gegenüber der kappenabhängigen Translationsinitiation.

Während der Elongation bindet die mit der entsprechenden Aminosäure beladene tRNA mit Hilfe des Elongationsfaktors eEF1 an die A-Stelle (*acceptor site*) des Ribosoms. Daraufhin wird eEF1 freigesetzt und die Peptidyltransferase des Ribosoms katalysiert die Ausbildung der Peptidbindung mit der an die ribosomale P-Stelle (*peptidyl site*) gebundenen Met-tRNA. Durch diese enzymatische Aktivität, die durch eine spezifische Base der 28S rRNA in der 60S-Untereinheit vermittelt wird, gehört das Ribosom in die Familie der Ribozyme. Durch den Elongationsfaktor eEF2 wird die Translokation der beiden tRNA's und der mRNA um exakt 3 Nukleotide katalysiert. Zum einen gelangt das nächste Kodon der mRNA an die A-Stelle des Ribosoms. Zum anderen erreicht die Met-tRNA_i^{Met} die E-Stelle (*exit site*), wodurch die an der P-Stelle gebildete, freie Start-tRNA vom Ribosom dissoziiert.

Dieser Elongationsprozess wird solange wiederholt, bis die A-Stelle des Ribosoms ein Stopp-Kodon erreicht und der Terminationsprozess ausgelöst wird. Da keine aa-tRNA existiert, dessen Anti-Kodon mit einem der Stopp-Kodons eine Basenpaarung eingehen kann, wird das Stopp-Kodon von dem Terminationsfaktor eRF1 (Sup45p in *S. cerevisiae*) erkannt. Die Bindung von eRF1 an die A-Stelle ändert die Aktivität der Peptidyltransferase, so dass letztendlich das carboxyterminale Ende der entstandenen Polypeptidkette von der tRNA gelöst und das Protein freigesetzt wird. Dieser Prozess wird durch die mit eRF1-interagierende GTPase eRF3 (Sup35p in *S. cerevisiae*) stimuliert. Nach Freisetzung des synthetisierten Proteins dissoziieren beide ribosomale Untereinheiten, wodurch die mRNA und die tRNA der zuletzt eingebauten Aminosäure freigesetzt werden. Eine effiziente Translation erfordert vermutlich die Ausbildung einer Ringstruktur (*closed loop*), bei der das 5'-Ende der mRNA über Proteine mit dem 3'-Ende verbunden wird (Abb. 7) (Mangus *et al.*, 2003; Kozak, 2004; Rajkowitsch *et al.*, 2004). An der Zirkularisierung sind der am 5'-Ende der mRNA gebundene Proteinkomplex eIF4F (eIF4A, eIF4E und eIF4G) und das am 3'-Ende der mRNA lokalisierte poly(A)-

Bindeprotein Pab1p beteiligt (Brune *et al.*, 2005; Svitkin und Sonenberg, 2006). Dieser Ringschluss erfolgt bei der Ausbildung des 48S-Komplexes über die direkte Interaktion von Pab1p mit eIF4G und erfordert die Präsenz der beiden Terminationsfaktoren eRF1 und eRF3 (Amrani *et al.*, 2008). Der Initiationsfaktor eIF4G stellt durch Assoziation mit sowohl eIF4A und eIF3, die beide mit der 40S-Untereinheit interagieren, als auch eIF4E, welches an die Kappenstruktur der mRNA bindet, die Verbindung der beiden Enden der mRNA her.

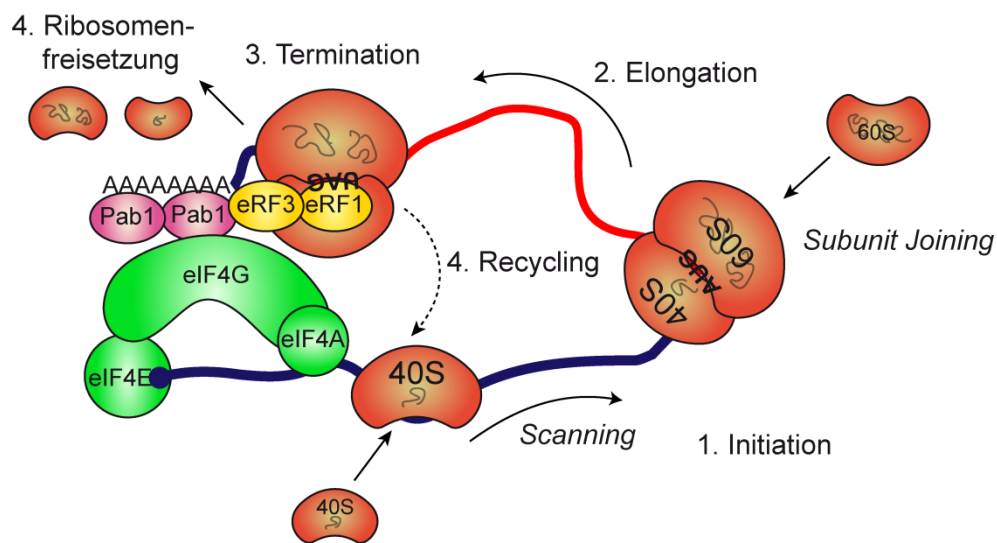


Abbildung 7: Schematische Darstellung der mRNA-Zirkularisierung.

Die Interaktion zwischen dem 5'- und dem 3'-Ende der mRNA erfolgt über den Initiationsfaktor eIF4G, welcher zum einen das mit dem poly(A)-Schwanz der mRNA interagierende Protein Pab1p, zum anderen das Protein eIF4E bindet. Diese Ringbildung fördert vermutlich das Umsetzen des Ribosoms auf dem 5'-UTR nach der Termination und beschleunigt über den schnelleren Re-Initiationsprozess die Translation. Die Interaktion zwischen eRF3 und Pab1p verbindet den Terminationsprozess, in dem eRF1 das Stopp-Kodon erkennt und eRF3 stimulierend wirkt, mit dem poly(A)-Schwanz der mRNA (modifiziert nach: Rajkowitsch *et al.*, 2004).

Des Weiteren wird durch die Zirkularisierung der mRNA ein *Recycling*-Prozess angenommen, der letztendlich zu einer schnelleren Translationsinitiation führt. Dies könnte über die Interaktion zwischen eRF3 und Pab1p im Anschluss an den Terminationsprozess erfolgen und die Umsetzung des Ribosoms auf den 5'-UTR der mRNA zur Folge haben (Uchida *et al.*, 2002; Rajkowitsch *et al.*, 2004). Außerdem scheint der Ringschluss der mRNA nicht nur bei der Translation im Zytoplasma, sondern auch bei Transportprozessen und der Stabilität der mRNA eine wichtige Funktion zu besitzen (Chekanova und Belostotsky, 2003).

1.9 Das SR-Protein Npl3p

Das pendelnde, mRNA-bindende Protein Npl3p gehört zur Familie der SR-Proteine, da die Proteinsequenz Wiederholungen von Dipeptiden, bestehend aus Serin (S) und Arginin (R), aufweist. Neben der carboxyterminalen SR/RGG-Domäne besitzt Npl3p eine aminoterminal lokalisierte APQE-Domäne mit unbekannter Funktion, die Wiederholungen der Aminosäuren Alanin (A), Prolin (P), Glutamin (Q) sowie Glutaminsäure (E) aufweist (Birney *et al.*, 1993), und zwei RNA-Erkennungsmotive (*RNA recognition motifs*, RRM's) (Abb. 8). Die SR/RGG-Domäne enthält neben den 8 SR-Motiven zusätzlich 15 RGG-Motive (Arginin, Glycin, Glycin), eine nicht repetitive Sequenz sowie das NLS (Senger *et al.*, 1998; Deka *et al.*, 2008). Für die direkte Interaktion der mRNA mit Proteinen sind sowohl die Primärstruktur, die mRNA-Sequenz, als auch die Sekundärstruktur von Bedeutung (Dreyfuss *et al.*, 2002; Giorgi und Moore, 2007).



Abbildung 8. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Npl3p.

In der aminoterminal lokalisierten APQE-Domäne von Npl3p, deren Funktion bislang unbekannt ist, befinden sich vier namensgebende repetitive Sequenzmotive mit den Aminosäuren Alanin, Prolin, Glutamin sowie Glutaminsäure. Neben den zwei für die Substratbindung notwendigen RNA-Erkennungsmotiven (RRM1 und RRM2) besitzt Npl3p die klassifizierende, carboxyterminal lokalisierte SR/RGG-Domäne, die zum einen für die Regulation des Proteins, zum anderen für die Interaktion mit dem Importrezeptor Mtr10p notwendig ist.

Für die direkte Interaktion der mRNA mit Proteinen sind sowohl die Primärstruktur, die mRNA-Sequenz, als auch die Sekundärstruktur von Bedeutung (Dreyfuss *et al.*, 2002; Giorgi und Moore, 2007). Ein humanes Homolog von Npl3p, SF2/ASF, bindet in Exonbereichen an mRNA-Konsensussequenzen, die zahlreiche Purine aufweisen (Sanford *et al.*, 2008). In höheren Eukaryonten binden SR-Proteine vorrangig an mRNA-Sequenzen, die innerhalb der Exonsequenzen lokalisiert sind und als Exon-Spleißverstärker (*exon splice enhancer*, ESE) bezeichnet werden. Sie besitzen dabei Funktionen während der mRNA-Prozessierung, z.B. im Spleißvorgang, in dem sie weitere Proteine an den Spleißapparat rekrutieren (Lamond, 1991; Caceres und Krainer, 1993; Huang *et al.*, 2003; Hargous *et al.*, 2006; Sanford *et al.*, 2008). In Eukaryonten sind die meisten SR-Proteine vorrangig im Zellkern lokalisiert. Jedoch sind einige SR-Proteine, wie SRp20, 9G8 oder SF2/ASF, beim nukleären Export der mRNA notwendig und daher in der Lage zwischen Zellkern und Zytoplasma zu pendeln (Caceres *et al.*, 1998; Siebel *et al.*, 1999; Graveley, 2000; Huang und Steitz, 2005).

In *S. cerevisiae* ist Npl3p zusammen mit zahlreichen Proteinen für die nukleäre Verpackung der mRNA in ein exportkompetentes mRNP sowie dessen anschließenden Transport in das Zytoplasma beteiligt (Krebber *et al.*, 1999). Npl3p wird durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II bereits während einer frühen Phase der Transkription zusammen mit den kappenbindenden Proteinen Cbp20p und Cbp80p an die mRNA rekrutiert (Abb. 9) (Lee *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2000; Lei *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2006). Während der Transkription erfolgt wahrscheinlich eine Konkurrenz zwischen Npl3p und Proteinen, die in der 3'-Prozessierung oder Termination involviert sind, um mRNA-Bindestellen (Bucheli und Buratowski, 2005; Bucheli *et al.*, 2007; Dermody *et al.*, 2008). Durch diesen Kontrollmechanismus werden vermutlich kryptische oder verfrühte Polyadenylierungssequenzen supprimiert.

An das Adapterprotein Npl3p bindet das Heterodimer Mex67p-Mtr2p (Lai und Tarn, 2004). Nach der Translokation des mRNP's durch den NPC dissoziiert Npl3p im Gegensatz zu anderen mRNA-bindenden, pendelnden Proteinen erst während der Translation von der mRNA. Der Zeitpunkt der Dissoziation ist für den Translationsprozess von Bedeutung, da eine verlängerte Assoziation von Npl3p mit der mRNA zu Translationsdefekten führt (Windgassen *et al.*, 2004). Anschließend wird Npl3p über einen RanGDP-abhängigen Mechanismus mit Hilfe von Mtr10p, einem Mitglied der Importin β -Transportrezeptor-Familie, re-importiert (Senger *et al.*, 1998). Im Zellkern dissoziiert Npl3p in Anwesenheit von mRNA und RanGTP von Mtr10p.

Die Bindung von Npl3p an Mtr10p erfolgt über dessen carboxyterminal lokalisierte SR-Domäne von Npl3p (Abb. 8). Die charakteristischen SR/RGG Sequenzmotive in der carboxyterminalen SR-Domäne sind für die Regulation von Npl3p essentiell. Beispielsweise werden einige Serinreste durch spezifische SR-Proteinkinasen phosphoryliert bzw. durch Phosphatasen dephosphoryliert (Colwill *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998; Stojdl und Bell, 1999; Graveley, 2000; Yun *et al.*, 2003). Im Zytoplasma wird Npl3p beispielsweise durch die Proteinkinase Sky1p (SRPK in Mammalia) am Serinrest der Position 411 (S411) phosphoryliert (Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2008). Ein Mutante von Npl3p mit einem Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin an dieser Position verhindert die Phosphorylierung durch Sky1p, wodurch Npl3p eine zytoplasmatische Lokalisation aufweist. Aufgrund der Phosphorylierung besitzt Npl3p eine im Vergleich zur Exportrate höhere Importrate und ist aufgrund dessen überwiegend im Zellkern lokalisiert. Durch diese Phosphorylierung wird die Bindeaffinität zu Mtr10p erhöht, wodurch die Importrate in den Zellkern gesteigert wird. Allerdings wird die

Dissoziation von Npl3p von der mRNA nicht beeinflusst (Siebel *et al.*, 1999; Windgassen *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2008). Das phosphorylierte Npl3p wird in den Zellkern re-importiert und bindet dort an die in der Transkription befindliche prä-mRNA. Während der 3'-Prozessierung der prä-mRNA wird die Phosphorylierung von Npl3p am S411 durch die Phosphatase Glc7p revertiert, wodurch die Affinität von Npl3p zur mRNA erhöht wird (Gilbert und Guthrie, 2004; Izaurrealde, 2004).

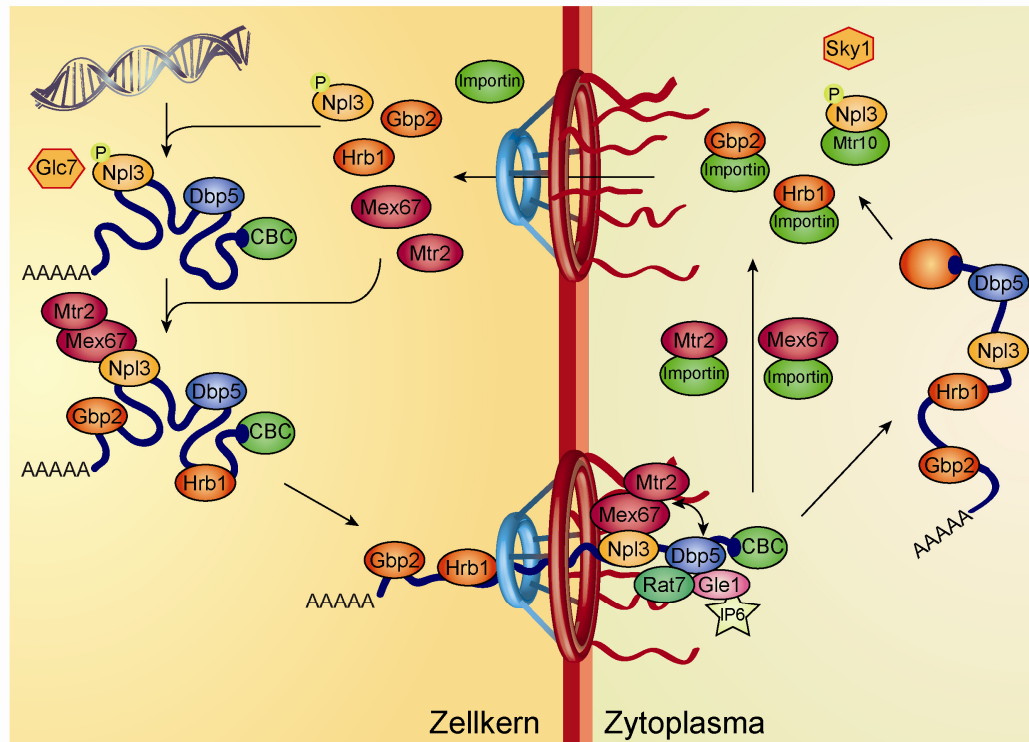


Abbildung 9: Modell des Funktionszyklus von Npl3p und Dbp5p.

Im Zellkern bindet Dbp5p und phosphoryliertes Npl3p während einer frühen Phase der Transkription die prä-mRNA. Durch die 3'-Prozessierung der prä-mRNA wird die Dephosphorylierung von Npl3p durch die Phosphatase Glc7p stimuliert. Nach der Rekrutierung von Mex67p-Mtr2p an Npl3p sowie weiteren Faktoren, wie beispielsweise Hrb1p oder Gbp2p, an die mRNA, erfolgt der Transport des exportkompetenten mRNP's in das Zytoplasma. Am NPC interagiert Mex67p-Mtr2p direkt mit den FG-Domänen spezifischer Nukleoporine. Des Weiteren fördert vermutlich die Helikaseaktivität von Dbp5p durch Auflösung von mRNA-Sekundärstrukturen den Translokationsprozess. Auf der zytoplasmatischen Seite des NPC's bildet Dbp5p mit den Nukleoporinen Rat7p und Gle1p sowie dem kleinen Signalmolekül InsP_6 (IP₆) einen Komplex. Dabei wirken Gle1p und InsP_6 stimulierend auf die Dbp5p-abhängige Dissoziation des Heterodimers Mex67p-Mtr2p von Npl3p. Im Zytoplasma werden Npl3p und Dbp5p von der mRNA abgelöst und binden an ihr Importin. Die Phosphorylierung von Npl3p durch die SR-Proteinkinase Sky1p verstärkt dessen Bindung an den Importrezeptor Mtr10p. Nach dem Re-Import in den Zellkern dissoziiert Npl3p in Anwesenheit von RanGTP und der mRNA von Mtr10p. Im Allgemeinen dissoziieren die mRNA-bindenden Proteine im Zytoplasma von der mRNA und werden nach Assoziation an ihr spezifisches Importin in den Zellkern re-importiert (modifiziert nach: Izaurrealde, 2004 und Kohler und Hurt, 2007).

Zusätzlich können Argininreste von Npl3p durch Argininmethyltransferasen methyliert werden (Henry und Silver, 1996; Shen *et al.*, 1998; Valentini *et al.*, 1999). Im Zellkern wird Npl3p durch die Methyltransferasen Hmt1p/Rmt1p an den RGG-Motiven posttranslational methyliert. Von 17 Methylierungen können 10 Argininreste in

RGG-Motiven dimethyliert werden (McBride *et al.*, 2005). Dies führt zu einer erhöhten Exportrate und beeinflusst die Interaktion von Npl3p mit Mtr10p. Bis heute ist die Bedeutung dieser Modifizierung noch größtenteils unverstanden. Allerdings sind diese unterschiedlichen, zahlreichen Modifizierungen von Npl3p sowohl für dessen Transport, Lokalisierung, Bindung an die mRNA als auch für die Interaktion mit anderen Proteinen von Bedeutung.

1.10 Die DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p

Das mRNA-bindende Protein Dbp5p gehört zu der DEAD-Box-Familie der RNA-Helikasen. Im Allgemeinen werden durch die enzymatische Aktivität von Helikasen die Wasserstoffbrückenbindungen von doppelsträngiger DNA oder RNA aufgelöst. Zum anderen können Helikasen die Dissoziation von Proteinen von Nukleinsäuren hervorrufen. Die Energie, die für das Entwinden von Sekundärstrukturen benötigt wird, resultiert aus der Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten (NTP's) (de la Cruz *et al.*, 1999). In den meisten Fällen ist für die Aktivität einer RNA-Helikase die Bindung an die RNA erforderlich und/oder diese wird von ihr stimuliert. Diese RNA-Helikasen sind in einer Vielzahl von metabolischen Prozessen, wie Transkription, mRNA-Export, Translation, Ribosomenbiogenese oder mRNA-Abbau, involviert und innerhalb der Eukaryonten hoch-konserviert (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1998; Cordin *et al.*, 2006). Die Mitglieder der Helikasen werden in drei Superfamilien gegliedert (Gorbalenya und Koonin, 1993). Dabei gehören die DEAD-Box-Proteine mit den meisten Mitgliedern zusammen mit den nah verwandten DEAH-, DExH- und DExD-Proteinen der Superfamilie II der RNA-Helikasen an.

Eine Konsensussequenz mit den aufeinander folgenden Aminosäuren Glutaminsäure, Glutamin, Alanin und Glutaminsäure (DEAD), welche der Familie den Namen gab, sowie das regulatorisch wirkende Q-Motiv sind spezifisch für DEAD-Box-Proteine (Abb. 10) (Linder und Daugeron, 2000; Linder und Stutz, 2001; Tanner *et al.*, 2003). Eine weitere strukturelle Gemeinsamkeit dieser Proteine ist die ATPase-Domäne, die aus einem hoch-konservierten Motiv I (Walker A-Motiv) und einem variablen Motiv II (Walker B-Motiv) besteht. RNA-Helikasen besitzen zusätzlich strukturell unterschiedlich aufgebaute Domänen (Motiv Ia, Ib, IV und V), die für die Substratbindung verantwortlich sind, sowie die katalytisch aktive SAT-Domäne, die entweder für die RNA-entwindende Aktivität oder die Dissoziation bzw. Umsetzung der Proteine von RNA's benötigt wird.

(Rocak und Linder, 2004; Jankowsky *et al.*, 2005; Jankowsky und Fairman, 2007; Yang *et al.*, 2007; Linder, 2008). Die dazu benötigte Energie wird durch eine ATP-Hydrolyse mit Hilfe der ATPase-Aktivität erzeugt. In *S. cerevisiae* existieren über 30 Proteine mit einer RNA-entwindenden Aktivität (Linder, 2006).

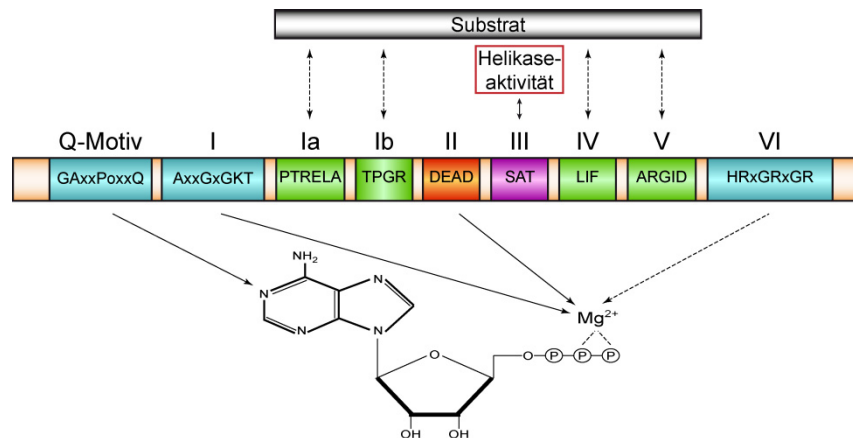


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von DEAD-Box RNA-Helikasen.

DEAD-Box RNA-Helikasen bestehen aus neun konservierten Domänen. Das regulatorisch wirkende Q-Motiv sowie das Motiv I (Walker A) und das Motiv II (Walker B) interagieren mit ATP und werden für dessen Hydrolyse benötigt. Dazu bildet das Motiv I eine P-Haarnadel-Struktur (*P-loop*) aus und interagiert über Mg^{2+} zusammen mit dem Motiv II, der DEAD-Box-Domäne, mit dem α - und β -Phosphat des ATP's. Die für die Aktivität der Helikase notwendigen und durch ATP-Bindung bzw. -Hydrolyse hervorgerufenen Konformationsänderungen werden durch das Motiv III, die SAT-Domäne, katalysiert. Die Substratbindung erfolgt wahrscheinlich über die Motive Ia, Ib, IV sowie V (modifiziert nach: Rocak und Linder, 2004).

Die ATP-abhängige DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p wurde in *S. cerevisiae* durch einen *Screen* identifiziert, in dem zahlreiche temperatursensitive Mutanten charakterisiert wurden, die einen Exportblock der mRNA aufwiesen und aufgrund dessen sich die mRNA im Zellkern anreichte (Snay-Hodge *et al.*, 1998). Die generelle mRNA-Exportfunktion von Dbp5p ist in Eukaronten hoch-konserviert. So ist die Primärsequenz von Dbp5p zu seinem humanen Homolog DDX19B zu 45% identisch und DDX19B besitzt ebenso wie Dbp5p essentielle Funktionen beim Menschen. (Schmitt *et al.*, 1999; Napetschnig *et al.*, 2007; Napetschnig *et al.*, 2009).

Dbp5p assoziiert mit der prä-mRNA während einer frühen Phase der Transkription, da es zum einen mit Komponenten des Transkriptionsfaktors TFIIF interagiert, zum anderen mit Yra1p (Abb. 9) (Zhao *et al.*, 2002; Estruch und Cole, 2003; Lund und Guthrie, 2005). Daher bindet Dbp5p die prä-mRNA wahrscheinlich nahe ihres 5'-Endes und könnte demzufolge eine regulierend auf den Transkriptionsprozess wirken. Des Weiteren ermöglicht die frühe Rekrutierung von Dbp5p an die prä-mRNA die spätere Umgestaltung des mRNP-Komplexes während des Transports durch den NPC. Dabei sind sowohl die ATPase- als auch die Helikaseaktivität von Dbp5p die treibenden Kräfte für den

Translokationsprozess und die Umstrukturierungen. Diesbezüglich akkumuliert ein großer Anteil des zytoplasmatisch lokalisierten Dbp5p an der Zellkernmembran. Der Transport von Dbp5p in das Zytoplasma erfolgt über das Exportin Xpo1p in einer Ran-abhängigen Art und Weise (Hodge *et al.*, 1999).

Nach der Translokation des mRNP's interagiert Dbp5p auf der zytoplasmatischen Seite des NPC's mit den Nukleoporinen Rat7p/Nup159p (CAN/NUP214 in Mammalia), Hrb187p/Nup82p, Nsp1p, Rip1p/Nup42p sowie Gle1p/Rss1p (GLE1 in Mammalia) (Belgareh *et al.*, 1998; Hodge *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 1999; Strahm *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2002) (Abb. 12). Der direkte Kontakt von Dbp5p mit Rat7p erfolgt über die aminoterminalen Bereiche (Weirich *et al.*, 2004; Tran und Wente, 2006). Zusätzlich wird ein Umgestaltungskomplex gebildet, bestehend aus Dbp5p, dessen regulatorisch wirkenden Aktivatorproteins Gle1p und dem Signalmolekül Inositolhexakisphosphat (InsP₆) (Watkins *et al.*, 1998; York *et al.*, 1999; Odom *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2004; Rayala *et al.*, 2004).

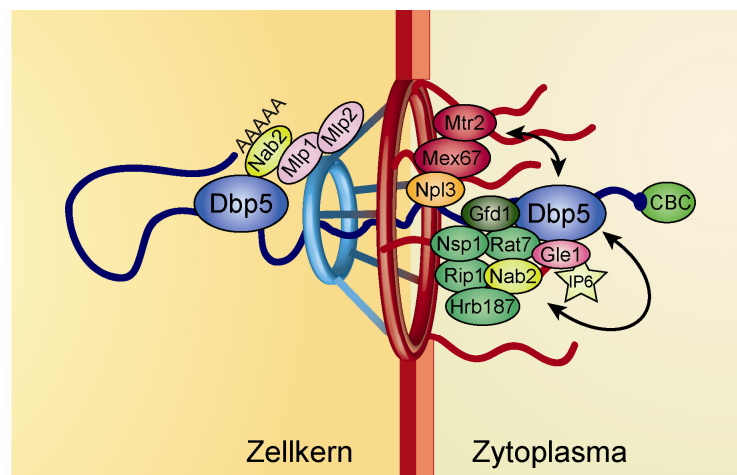


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Interaktionen von Dbp5p am NPC.

Im Zellkern erfolgt die Assoziation von Dbp5p mit Nab2p, über die eine Wechselwirkung mit den im nukleären mRNA-Abbau involvierten Mlp1p und Mlp2p ermöglicht wird. Auf der zytoplasmatischen Seite interagiert Dbp5p mit Gle1p und den Nukleoporinen Rat7p, Nsp1p, Rip1p und Hrb187p. Zusätzlich vermittelt der Komplex, bestehend aus Dbp5p sowie den Ko-Aktivatoren Gle1p zusammen mit dem Signalmolekül InsP₆ (IP6), die Dissoziation des heterodimären Exportrezeptorkomplexes Mex67p-Mtr2p sowie von Nab2p am NPC.

Der carboxyterminale Bereich von Gle1p interagiert sowohl mit Dbp5p, als auch mit dem Nukleoporin Rip1p. Vergleichbar mit den meisten RNA-Helikasen ist ebenso bei Dbp5p die katalytische Aktivität ohne die Ko-Aktivatoren Gle1p und InsP₆ sehr gering und das Erreichen der maximalen Aktivität von der ATP-Konzentration abhängig. Jedoch liegt die notwendige ATP-Menge über der physiologischen Konzentration. Durch die Interaktion von Dbp5p mit Gle1p und InsP₆ werden die Konzentrationen der RNA und des ATP's, die für die optimale Aktivierung benötigt würden, herabgesetzt, so dass die katalytische

Aktivität von Dbp5p um das Hundertfache gesteigert wird. *In vitro* wird die RNA-abhängige ATPase-Aktivität von Dbp5p durch Gle1p erhöht, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Gle1p und InsP₆ wird diese noch weiter gesteigert (Alcazar-Roman *et al.*, 2006; Weirich *et al.*, 2006). Auf der zytoplasmatischen Seite des NPC's wird Mex67p-Mtr2p von der mRNA durch Dbp5p entfernt (Lund und Guthrie, 2005). Zum einen könnte die einseitige Lokalisation von Gle1p und InsP₆ an den zytoplasmatischen Fibrillen des NPC's die nukleäre Dissoziation von Mex67p-Mtr2p von dem mRNP durch die im Zytoplasma stattfindende Aktivierung von Dbp5p verhindern. Zum anderen wird durch die Dissoziation des heterodimeren Exportrezeptorkomplexes vermutlich der Rücktransport des mRNP's in den Zellkern inhibiert. Des Weiteren ist das InsP₆-produzierende Enzym Ipk1p ebenfalls auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert. Zusätzlich ist Dbp5p für die Dissoziation des mRNP's von dem NPC erforderlich (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Hodge *et al.*, 1999; Strahm *et al.*, 1999).

Neben Gle1p und InsP₆ ist die Interaktion von Dbp5p mit zwei weiteren Proteinen, dem poly(A)-Schwanz bindenden Protein Nab2p und dem NPC-assoziierten Protein Gfd1p, beschrieben (Hodge *et al.*, 1999; Suntharalingam *et al.*, 2004; Estruch *et al.*, 2005; Grant *et al.*, 2008). Die Funktion von Gfd1p beim mRNA-Export ist noch nicht bekannt. Vermutlich ist Gfd1p in dem finalen Schritt beim mRNA-Export involviert und hilft Dbp5p bei der Umstrukturierung des mRNP's. Das pendelnde Protein Nab2p hingegen moduliert den mRNA-Export sowohl über eine Längenkontrolle des poly(A)-Schwanzes als auch über die Qualitätskontrolle. Des Weiteren assoziiert Nab2p auf der nukleären Seite des NPC's mit Mlp1p und Mlp2p, das für die Qualitätskontrolle der mRNA von Bedeutung ist (Galy *et al.*, 2004; Suntharalingam *et al.*, 2004; Vinciguerra *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2007). Bislang ist kein anderes Protein, neben Dbp5p, bekannt, das ähnliche Funktionen beim mRNA-Export durch den NPC aufweist oder Aufgaben von Dbp5p übernehmen kann.

1.11 Zielsetzungen dieser Arbeit

Die eukaryontische Genexpression ist ein essentieller, komplexer Prozess, der sich in einzelne Schritte gliedert und einer strengen Regulation unterliegt, an der zahlreiche Proteine involviert sind. Nach der im Zellkern stattfindenden Transkription der DNA in die komplementäre prä-mRNA erfolgen zahlreiche Prozessierungen dieser zur reifen mRNA. Diese wird anschließend in das Zytoplasma transportiert und mit Hilfe der 80S-Ribosomen in das entsprechende Protein translatiert.

Die in *S. cerevisiae* identifizierten und charakterisierten mRNA-bindenden Proteine Dbp5p und Npl3p besitzen wichtige Funktionen während des mRNA-Exports. Beide Proteine sind sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert, wobei Npl3p zwischen beiden Kompartimenten pendelt. Des Weiteren konnte für beide Proteine eine Ko-Sedimentation mit Polysomen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen legen zytoplasmatische Funktionen von dem SR-Protein Npl3p und der DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p bei der Translation nahe. Diese sollten mit der vorliegenden Arbeit am Modellorganismus *S. cerevisiae* erstmals identifiziert werden.

Dafür sollten verschiedene genetische, biochemische und molekularbiologische Ansätze verwendet werden. Zusätzlich sollte durch Fehlen, Überexpression bzw. Mutationen dieser Gene ihr Einfluss auf die Genexpression analysiert und die Folgen auf die Translation und andere zelluläre Prozesse bei der Genexpression untersucht werden. Über Interaktionsstudien sollten mögliche Bindeproteine identifiziert werden, welche die etwaigen Funktionen während der Translation unterstützen könnten.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Soweit es nicht besonders vermerkt ist, wurden alle Chemikalien im höchsten Reinheitsgrad von den Firmen Acros (Geel, Belgien), Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland), Apollo Scientific Limited (Derbyshire, England), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Difco (Detroit, USA), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Fisher Scientific (Nidderau, Deutschland), GE Healthcare (Uppsala, Schweden), Invitrogen (Frankfurt am Main, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), Serva Feinbiochemika (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Th. Geyer (Renningen, Deutschland) sowie VWR International (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Verwendung	Produkt und Bezugsquelle
Elektrophorese	Wide Mini-Sub Cell GT (BioRad Laboratories, München, Deutschland) für Agarosegele
	Mini-Protran 3 Electrophoresis Cell (BioRad Laboratories, München, Deutschland) für SDS-Polyacrylamidgele
	Vertical Gel Electrophoresis Apparatus (Model V15.17) (Biometra, Göttingen, Deutschland) für SDS-Polyacrylamidgele
Heizblöcke	Ori-Blok OB3 (Techne/Thermo-Dux, Wertheim, Deutschland)
	Thermomixer Comfort R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
	Thermostat 5320 (BioRad Laboratories, München, Deutschland)
Inkubatoren	Schüttelinkubator AJ112 (Infors, Bottmingen, Schweiz)
	Schüttelinkubator Innova 4230 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA)
	Brutschrank BK600 (Haereus, Hanau, Deutschland)
	Brutschrank B6420 (Haereus, Hanau, Deutschland)
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskop Leitz Aristoplan mit Kamera Hamamatsu ORCA ER (Leica, Wetzlar, Deutschland)
	Fluoreszenzmikroskop Leica DM6000B (Leica, Wetzlar, Deutschland) mit der Kamera Hamamatsu 1394 ORCA-II ER (Herrsching am Ammersee, Deutschland)
	Lichtmikroskop Leitz Biomed Typ 020-507-010 (Leica, Wetzlar, Deutschland)
	Tetrademikroskop Nikon Eclipse E400 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland)
Netzgeräte	Power Pac 3000 Power Supply (BioRad Laboratories, München, Deutschland)
	Power Supply Model 100/200 (BioRad Laboratories, München, Deutschland)
	Power Supply EV231 (Peqlab, Erlangen, Deutschland)

Zentrifugen	<p>Kühlzentrifuge Model Avanti J26-XP (Beckmann, München, Deutschland)</p> <p>Kühlzentrifuge Model J-6 M/E (Beckmann, München, Deutschland)</p> <p>Kühlzentrifuge Model JS2-21 M/E (Beckmann, München, Deutschland)</p> <p>Kühlzentrifuge Multifuge 3L-R (Haereus, Hanau, Deutschland)</p> <p>Tischkühlzentrifuge Biofuge Fresco (Haereus, Hanau, Deutschland)</p> <p>Tischzentrifuge Biofuge Pico (Haereus, Hanau, Deutschland)</p> <p>Ultrazentrifuge Model L8-60M (Beckmann, München, Deutschland)</p> <p>Ultrazentrifuge Model L8-M (Beckmann, München, Deutschland)</p> <p>Ultrazentrifuge Optima™ LE80-K (Beckmann, München, Deutschland)</p> <p>Vakuumzentrifuge SpeedVac SC100 (Savant Instruments, New York, New York, USA) mit Gefriertrocknungsanlage Leybold-Heraeus Iyovac GT2 (Haereus, Hanau, Deutschland) und Drehschieber-Vakuumpumpe Typ RZ8 (Vacuubrand, Wertheim, Deutschland)</p> <p>Zentrifuge Megafuge 1.0 (Haereus, Hanau, Deutschland)</p>
Sonstiges	<p>ÄKTA™purifier 10 mit Fraktionierer (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)</p> <p>Autoklav (Biodemis, Gießen, Deutschland)</p> <p>AutoLumat Plus LB953 (Berthold Technologies GmbH & Co KG, Bad Wildbad, Deutschland)</p> <p>BioMate 3 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)</p> <p>Dichtegradientenfraktionierer Isco Model 640 mit Durchflusszytometer, Absorptionsmonitor Model UA-5 und Fraktionssammler (Teledyne Isco, Lincoln, Nebraska, USA)</p> <p>FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich)</p> <p>Feinwaage Satorius Research R200D (Satorius, Göttingen, Deutschland)</p> <p>Gradientenmaschine Gradient Master (BioComp Instruments, Inc., Fredericton, Kanada)</p> <p>Magnetrührer Ikamag Ret (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland)</p> <p>Mikrowelle</p> <p>Milli-Q Water Purification System (Millipore, Eschborn, Deutschland)</p> <p>Mini Rocker MR1 (Peqlab, Erlangen, Deutschland)</p> <p>PCR-Gerät Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA)</p> <p>PerfectBlue™ Semi-Dry-Elektroblotter (Peqlab, Erlangen, Deutschland)</p> <p>pH-Meter inoLab pH 720 (WTW, Weilheim, Deutschland)</p> <p>Programmierbarer Dichtegradientenfraktionierer Isco Model 160 mit Durchflusszytometer, Absorptionsmonitor Model UA-6 und Fraktionssammler Foxy Jr. (Teledyne Isco, Lincoln, Nebraska, USA)</p> <p>Röntgenfilmentwickler X-OMAT 2000 Processor (Kodak, Rochester, New York, USA)</p> <p>Sonifier W-250 D (G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland)</p> <p>SpektraMax 340PC³⁸⁴ (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland)</p> <p>Stuart Rotator SB3 (Dynalab Corp., Rochester, New York, USA)</p> <p>Szintillationszähler LS1701 (Beckmann, München, Deutschland)</p> <p>Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad Laboratories, München, Deutschland)</p> <p>Ultrospec 3000 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)</p> <p>UV-Transilluminator 2040EV (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) mit Intas Geldokumentationssystem</p> <p>Vortexer VF2 und IKA-Vibrax-VXR (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland)</p> <p>Waage Satorius L420P (Satorius, Göttingen, Deutschland)</p>

2.3 Medien

2.3.1 Medien für Arbeiten mit *Escherichia coli*

Für die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Die positive Selektion von Bakterien, die eine plasmidkodierende Resistenz besaßen, erfolgte durch Zugabe von sterilfiltrierten Antibiotika, Ampicillin (100 µg/mL) oder Kanamycin (30 µg/mL), zum autoklavierten Medium.

Tab. 2: Medien für Arbeiten mit *E. coli*

Medium	Anteil	Chemikalien
LB-Medium	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	1% (w/v)	Pepton aus Casein
	1% (w/v)	NaCl
	add 1.000 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde autoklaviert

Zur Herstellung von LB-Festmedium wurde dem LB-Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

2.3.2 Medien für Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Die Zusammensetzung und Herstellung der Medien für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) erfolgte nach Standardprotokollen (Adams *et al.*, 2005). Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurde Hefevollmedium (*yeast extract peptone dextrose medium*; YPD-Medium) verwendet. Zur positiven Selektion von Hefezellen, die ein plasmid- oder genomkodiertes Markergen besitzen, welches die Stoffwechselauxotrophie komplettiert, wurde das Aminosäure-bzw. Basenselektionsmedium so gewählt, dass es das Produkt des jeweiligen Stoffwechselweges nicht enthielt. Zur Selektion von Uracil-auxotrophen Zellen wurde 5-Fluoroorotsäure-Medium (*5-Fluoroorotic Acid-Medium*; FOA-Medium) verwendet (Rose *et al.*, 1990), da das Produkt des Gens *URA3* die 5-Fluoroorotsäure zu der toxischen Substanz 5-Fluorouracil metabolisiert (Boeke *et al.*, 1987).

Tab. 3: Flüssigmedien für die Kultivierung von *S. cerevisiae*

Medium	Anteil	Chemikalien
YPD-Medium	1% (w/v)	Hefeextrakt
	2% (w/v)	Pepton
	2% (w/v)	Glukose
	add 1.000 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde autoklaviert
Aminosäureselektionsmedium	0,67% (w/v)	Hefe-Stickstoff-Basis
	0,2% (w/v)	Aminosäure-Dropout-Mix
	add 900 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde autoklaviert
	add 1.000 mL	autoklavierte Glukose (20% (w/v))

Tab. 4: Festmedien für die Kultivierung von *S. cerevisiae*

Medium	Anteil	Chemikalien
YPD-Medium	1% (w/v)	Hefeextrakt
	2% (w/v)	Pepton
	2% (w/v)	Glukose
	3% (w/v)	Agar
	add 1.000 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde autoklaviert
Aminosäure- und Basenselektionsmedium	0,67% (w/v)	Hefe-Stickstoff-Basis
	0,2% (w/v)	Dropout-Mix
	add 300 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde autoklaviert
	3% (w/v)	Agar
	add 600 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde autoklaviert
	nach dem Autoklavieren wurden beide Lösungen vereinigt add 1.000 mL	autoklavierte Glukose (20% (w/v))
B-Platten-Medium (Mating Typ Test)	0,67% (w/v)	Hefe-Stickstoff-Basis
	3% (w/v)	Agar
	add 900 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde autoklaviert
	add 1.000 mL	autoklavierte Glukose (20% (w/v))
FOA-Medium	0,67% (w/v)	Hefe-Stickstoff-Basis
	0,2% (w/v)	Dropout-Mix ohne Uracil
	2% (w/v)	Glukose
	0,005% (w/v)	Uracil
	0,1% (w/v)	5-Fluoroorotsäure
	add 500 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde sterilfiltriert
	3% (w/v)	Agar
	add 500 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde autoklaviert
nach dem Autoklavieren bzw. Sterilfiltrieren wurden die beiden Lösungen vereinigt		

Sporulationsmedium	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	1,5% (w/v)	Kaliumacetat
	add 500 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde autoklaviert
	0,05% (w/v)	Glukose
	0,035% (w/v)	Threonin
	0,01% (w/v)	Phenylalanin
	0,004% (w/v)	Adenin
	0,004% (w/v)	Tyrosin
	0,004% (w/v)	Uracil
	0,002% (w/v)	Arginin
	0,002% (w/v)	Histidin
	0,002% (w/v)	Leucin
	0,002% (w/v)	Lysin
	0,002% (w/v)	Methionin
	0,002% (w/v)	Tryptophan
	add 500 mL	ddH ₂ O → Lösung wurde sterilfiltriert
	nach dem Autoklavieren bzw. Sterilfiltrieren wurden die beiden	
	Lösungen vereinigt	

2.4 Lösungen und Puffer

Die Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in ddH₂O angesetzt und steril filtriert.

Tab. 5: Basislösungen und -puffer

Lösung/Puffer	Anteil	Chemikalien
DNA-Probenpuffer (6×, pH 7,0)	25% (w/v)	Ficoll 400
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25% (w/v)	Xylencyanol
	3 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8,0)
Gradienten-Lysepuffer	20 mM	Hepes-KOH (pH 7,6)
	100 mM	KOAc
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	Na ₂ -EDTA
	1 mM	DTT
	355 µM	Cycloheximid
	0,1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

PBS (1×, pH 8,0)	150 mM	NaCl
	35 mM	KCl
	15 mM	Na ₂ HPO ₄
	1 mM	KH ₂ PO ₄
PBST (1×, pH 8,0)	150 mM	NaCl
	35 mM	KCl
	15 mM	Na ₂ HPO ₄
	1 mM	KH ₂ PO ₄
	0,1% (v/v)	Tween-20
PBSMKT-Puffer (pH 8,0)	150 mM	NaCl
	35 mM	KCl
	15 mM	Na ₂ HPO ₄
	1 mM	KH ₂ PO ₄
	3 mM	KCl
	2,5 mM	MgCl ₂
	0,1% (v/v)	Triton X-100
SDS-Elektrophoreselaufpuffer (1×)	25 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	192 mM	Glycin
	0,15% (w/v)	SDS
SDS-Probenauftragungspuffer (1×)	62,5 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	10% (v/v)	Glycerin
	0,15% (w/v)	SDS
	5% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	0,001% (w/v)	Bromphenolblau
TAE-Puffer (1×, pH 7,5)	40 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	1 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8,0)
	0,115% (v/v)	CH ₃ COOH
TBS (pH 7,2)	25 mM	Tris/HCl
	150 mM	NaCl
	2 mM	KCl
TBST (pH 7,2)	25 mM	Tris/HCl
	150 mM	NaCl
	2 mM	KCl
	0,1% (v/v)	Tween-20
TE-Puffer (1×, pH 7,5)	10 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	1 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8,0)
Western Blot Transfer Puffer	25 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
	192 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol

Tab. 6: Lösungen für die Mini-Plasmid-Isolierung (siehe 3.1.1)

Lösung/Puffer	Anteil	Chemikalien
Resuspensions-Puffer	25 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	50 mM	Glukose (20% (w/v))
	10 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8,0)
Lyse-Puffer	1% (w/v)	SDS
	0,2 M	NaOH
Neutralisations-Puffer	2,5 M	KAc
	9,6% (v/v)	CH ₃ COOH
	wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt	

Tab. 7: Lösungen für die Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae* (siehe 3.2.3)

Lösung/Puffer	Anteil	Chemikalien
Detergenz-Lyse-Puffer	2% (w/v)	Triton X-100
	1% (w/v)	SDS
	0,1 M	NaCl
	10 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	1 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8,0)

Tab. 8: Lösungen für die Präparation von Plasmiden aus *S. cerevisiae* (siehe 3.2.5)

Lösung/Puffer	Anteil	Chemikalien
Cracking-Puffer	2% (v/v)	Triton X-100
	1% (w/v)	SDS
	0,2 M	NaCl
	10 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	1 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8,0)

Tab. 9: Lösungen für die Transformation von *S. cerevisiae* (siehe 3.2.6)

Lösung/Puffer	Anteil	Chemikalien
TE/LiOAc	10% (v/v)	LiOAc (10×; pH 7,5)
	90% (v/v)	TE-Puffer (pH 7,5)
PEG 4000/TE/LiOAc	40% (v/v)	PEG 4000
	10% (v/v)	LiOAc (10×; pH 7,5)
	10 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	1 mM	Na ₂ -EDTA (pH 8,0)

Tab. 10: Lösungen für die dualen Luziferasereporterversuche (siehe 3.2.8)

Lösung/Puffer	Anteil	Chemikalien
0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8)	90,8 mM	K ₂ HPO ₄
	9,2 mM	KH ₂ PO ₄
0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0)	57,7 mM	Na ₂ HPO ₄
	42,3 mM	NaH ₂ PO ₄
Luziferinlösung	25 mM	Glycylglycine (pH 7,8)
	0,2 mM	Luziferin
Luziferase-Reaktions-Puffer	25 mM	Glycylglycine (pH 7,8)
	15 mM	Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8)
	15 mM	MgSO ₄
	4 mM	EGTA (pH 7,0)
	2 mM	ATP
	1 mM	DTT
Z-Puffer (pH 7,0)	100 mM	Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0)
	10 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄

Tab. 11: Lösungen für die Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen (siehe 3.3.5)

Lösung / Puffer	Anteil	Chemikalien
Färbelösung	0,125% (w/v)	Coomassie-Brilliant Blue R250
	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
Fixierlösung	50 % (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
Entfärbelösung	30 % (v/v)	Methanol
	5% (v/v)	Essigsäure

Tab. 12: Lösungen für die Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen (siehe 3.3.9)

Lösung / Puffer	Anteil	Chemikalien
Lysepuffer (pH 8,0)	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
Waschpuffer I (pH 8,0)	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
Waschpuffer II (pH 8,0)	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	40 mM	Imidazol

Elutionspuffer (pH 8,0)	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol

Tab. 13: Lösungen für die *in vitro* RNA Ko-Immunpräzipitation (siehe 3.3.11)

Lösung / Puffer	Anteil	Chemikalien
RNA-Bindepuffer	20 mM	HEPES (pH 7,4)
	100 mM	KCl
	10 mM	NaCl
	4 mM	MgCl ₂
	0,2 mM	Na ₂ -EDTA
	20% (v/v)	Glycerin
	1 mM	DTT
	0,5% (v/v)	NP-40

Tab. 14: Lösungen für die immuncyto- und immunhistochemischen Methoden (siehe 3.4)

Lösung / Puffer	Anteil	Chemikalien
Aby-Waschlösung 1	0,1 M	Tris/HCl (pH 9,0)
	0,15 M	NaCl
Aby-Waschlösung 2	0,1 M	Tris/HCl (pH 9,5)
	0,1 M	NaCl
Antikörper-Blockierungspuffer	0,1 M	Tris/HCl (pH 9,0)
	0,15 M	NaCl
	5% (v/v)	hitzeinaktiviertes FCS
	0,3% (v/v)	Triton X-100
P-Lösung	1,2 M	Sorbitol
	0,1 M	Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,5)
Mounting-Medium	2% (w/v)	n-Propyl-Gallat
	80% (v/v)	Glycerol (100% (v/v)) in PBS (pH 8,0)
Dendhardts-Lösung (50×)	1% (w/v)	Ficoll
	1% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
	1% (w/v)	BSA (BSA Fraktion V)
SSC (20×, pH 7,0)	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat
Hybridisierungs-Puffer	50% (v/v)	deionisiertes Formamid
	4×	SSC (pH 7,0)
	1×	Dendhardts-Lösung
	125 µg/mL	tRNA (10 mg/mL)
	10% (w/v)	Dextransulfat

2.5 Stämme

2.5.1 Bakterienstämme

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *DH5α* mit dem Genotyp (*supE44 lacZU169(80lacM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA69 thi-1 relA149*) verwendet, welcher sich von dem *E. coli*-Stamm DH1 ableitet (Hanahan, 1983). Für die Herstellung von rekombinanten Proteinen wurde der *E. coli*-Stamm *BL21 (DE3)* mit dem Genotyp (*F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B- m_B-), galλ (DE3)*) verwendet.

2.5.2 Hefestämme

Tab. 15: Übersicht der verwendeten *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
HKY35	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995
HKY36	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 his3Δ200</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995
HKY124	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 his3Δ200 rat7-1</i>	Gorsch <i>et al.</i> , 1995
HKY128	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 rat8::HIS3 + CEN LEU2 rat8-3</i>	Gorsch <i>et al.</i> , 1995
HKY130	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63 rat8-2</i>	Snay-Hodge <i>et al.</i> , 1998
HKY157	<i>MATa ura3 leu2 his3 npl3::HIS + CEN URA3 Npl3-myc</i>	Heike Krebber
HKY158	<i>MATa ura3Δ1 leu2 his3 lys2 ade2 ade3 npl3::HIS3 + CEN LEU2 npl3-1</i>	Lee <i>et al.</i> , 1996
HKY159	<i>MATa ura3Δ1 leu2 his3 lys2 ade2 ade3 npl3::HIS3 + CEN LEU2 npl3-3</i>	Lee <i>et al.</i> , 1996
HKY160	<i>MATa ura3Δ1 leu2 his3 lys2 ade2 ade3 npl3::HIS3 + CEN LEU2 npl3-17</i>	Lee <i>et al.</i> , 1996
HKY161	<i>MATa ura3Δ1 leu2 his3 lys2 ade2 ade3 npl3::HIS3 + CEN LEU2 npl3-41</i>	Lee <i>et al.</i> , 1996
HKY171	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 ade2 + CEN TRP pab1-53</i>	Morissay <i>et al.</i> , 1999
HKY291	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i>	Heike Krebber
HKY298	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 hrb1::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY369	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 gbp2::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY380	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 npl3::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY381	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i>	Euroscarf
HKY391	<i>MATa ura3 leu2Δ3 trp1Δ1 his3Δ11,15 ade2Δ1 can1Δ100 tif1::HIS3 tif2::URA3 + CEN LEU2 tif1</i>	Schmid and Linder, 1991
HKY392	<i>MATa ura3 leu2Δ3 trp1Δ1 his3Δ11,15 ade2Δ1 can1Δ100 tif1::HIS3 tif2::URA3 + CEN LEU2 tif1</i>	Schmid and Linder, 1991
HKY396	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ3,112 trp1Δ lys2Δ20 his4Δ713 met2Δ1 tef2Δ2 tef1::LEU2 + CEN URA3 tef2-2</i>	Dinman and Kinzy, 1997
HKY397	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ3,112 trp1Δ lys2Δ20 his4Δ713 met2Δ1 tef2Δ2 tef1::LEU2 + CEN URA3 tef2-3</i>	Dinman and Kinzy, 1997
HKY398	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ3,112 trp1Δ lys2Δ20 his4Δ713 met2Δ1 tef2Δ2 tef1::LEU2 + CEN URA3 tef2-4</i>	Dinman and Kinzy, 1997
HKY399	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ3,112 trp1Δ lys2Δ20 his4Δ713 met2Δ1 tef2Δ2 tef1::LEU2 + CEN URA3 tef2-7</i>	Dinman and Kinzy, 1997

HKY400	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ3,112 trp1Δ lys2Δ20 his4Δ713 met2Δ1 tef2Δ2 tef1::LEU2 + CEN URA3 tef2-9</i>	Dinman and Kinzy, 1997
HKY401	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ3,112 trp1Δ lys2Δ20 his4Δ713 met2Δ1 tef2Δ2 tef1::LEU2 + CEN URA3 tef2-10</i>	Dinman and Kinzy, 1997
HKY402	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ3,112 trp1Δ lys2Δ20 his4Δ713 met2Δ1 tef2Δ2 tef1::LEU2 + CEN URA3 tef2-13</i>	Dinman and Kinzy, 1997
HKY408	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 prt1-1</i>	Mark Ashe
HKY409	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 prt1-1</i>	Mark Ashe
HKY410	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 ade2 cdc33-1</i>	Mark Ashe
HKY412	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 ade2 tif3::ADE2</i>	Mark Ashe
HKY419	<i>MATa ura3 leu2 trp1 lys2 his3 ade2 tif4631::LEU2 tif4632::ura3 + CEN TRP1 tif4632-1</i>	Mark Ashe
HKY420	<i>MATa ura3 leu2 trp1 lys2 his3 ade2 tif4631::LEU2 tif4632::ura3 + CEN TRP1 tif4632-6</i>	Mark Ashe
HKY421	<i>MATa ura3 leu2 trp1 lys2 his3 ade2 tif4631::LEU2 tif4632::ura3 + CEN TRP1 tif4632-8</i>	Mark Ashe
HKY422	<i>MATa ura3 leu2 trp1 lys2 his3 ade2 tif4631::LEU2 tif4632::ura3 + CEN TRP1 tif4632-430</i>	Mark Ashe
HKY423	<i>MATa ura3 leu2 trp1 lys2 his3 ade2 tif4631::LEU2 tif4632::ura3 + CEN TRP1 tif4632-N300</i>	Mark Ashe
HKY424	<i>MATa ura3 leu2 trp1 lys2 his3 ade2 tif4631::LEU2 tif4632::ura3 + CEN TRP1 tif4632-459</i>	Mark Ashe
HKY427	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ3,112 trp1Δ2891 his3Δ200 ade1-14 sup35 {PSI⁺}</i>	Bidou <i>et al.</i> , 2000
HKY437	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ1 lys2Δ801 ade2Δ101 his3Δ200 ded1::TRP1 + CEN LEU2 ded1-120</i>	Chuang <i>et al.</i> , 1997
HKY438	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ1 lys2Δ801 ade2Δ101 his3Δ200 ded1::TRP1 + CEN LEU2 ded1-199</i>	Chuang <i>et al.</i> , 1997
HKY439	<i>MATa ura3 leu2 trp1 ded1-21</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 1996
HKY440	<i>MATa ura3 leu2 ded1-21</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 1996
HKY446	<i>MATa ura3Δ1 his5Δ2 ade2Δ1 can1Δ100 sup45-2</i>	Stansfield <i>et al.</i> , 1997
HKY449	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 ade2 pab1::HIS3 + CEN TRP pab1-101</i>	Mark Ashe
HKY450	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 ade2 pab1::HIS3 + CEN TRP pab1-16</i>	Mark Ashe
HKY473	<i>MATa ura3 leu2Δ1 trp1Δ63 ade2Δ1 lys sup45-2</i>	Heike Krebber
HKY475	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 ade3 rat8::HIS3 pab1::HIS3 + CEN LEU2 rat8-3 + CEN TRP1 pab1-53 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY479	<i>MATa ura3 trp1Δ63 his3 rat8::HIS3 sup45-2 + CEN LEU2 rat8-3 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY488	<i>MATa ura3Δ52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rat8::HIS3 + 2μ LEU2 myc-RAT8</i>	diese Arbeit
HKY492	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 upf1::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY493	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 upf2::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY494	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 upf3::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY522	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 rat8::HIS3 + CEN URA3 GFP-RAT8</i>	diese Arbeit

HKY523	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 rat8::HIS3 + CEN LEU2 GFP-rat8-2</i>	diese Arbeit
HKY524	<i>MATa ura3 trp1 lys2 his3 upf1::kanMX4 rat8::HIS3 + CEN LEU2 rat8-3</i>	diese Arbeit
HKY526	<i>MATa ura3 lys2 his3 upf2::kanMX4 rat8::HIS3 + CEN LEU2 rat8-3</i>	diese Arbeit
HKY528	<i>MATa ura3 trp1 lys2 his3 upf3::kanMX4 rat8::HIS3 + CEN LEU2 rat8-3</i>	diese Arbeit
HKY530	<i>MATa ura3 leu2 upf1::kanMX4 rat8-2</i>	diese Arbeit
HKY532	<i>MATa ura3 trp1 leu2 upf2::kanMX4 rat8-2</i>	diese Arbeit
HKY534	<i>MATa ura3 leu2 ade upf3::kanMX4 rat8-2</i>	diese Arbeit
HKY535	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63 rat8-2 pab1::HIS3 + CEN TRP1 pab1-53 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY537	<i>MATa ura3Δ52 trp1Δ63 rat8-2 pab1::HIS3 + CEN TRP1 pab1-16 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY540	<i>MATa ura3 rat8-2 sup45-2 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY541	<i>MATa ura3 his3 trp1 rat8-2 pab1::HIS3 + CEN TRP1 pab1-101 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY544	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 rat8::HIS3 SUP45:TAP:k.l.URA3 + CEN LEU2 GFP-rat8-2</i>	diese Arbeit
HKY546	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 rat8::HIS3 SUP35:TAP:k.l.URA3 + CEN LEU2 GFP-rat8-2</i>	diese Arbeit
HKY548	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 rat8::HIS3 SUP45:TAP:k.l.URA3 + CEN URA3 GFP-RAT8</i>	diese Arbeit
HKY550	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 ade rat8::HIS3 SUP35:TAP:k.l.URA3 + CEN URA3 GFP-RAT8</i>	diese Arbeit
HKY552	<i>MATa ura3 leu2 ade sup35-21</i>	Cosson <i>et al.</i> , 2002
HKY562	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 rat8::HIS3 sup35-21 + CEN LEU2 rat8-3 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY563	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 rat8::HIS3 pab1::HIS3 + CEN TRP1 pab1-16 + CEN LEU2 rat8-3 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY564	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 rat8::HIS3 pab1::HIS3 + CEN TRP1 pab1-101 + CEN LEU2 rat8-3 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY566	<i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 ade2 rat8-2 sup35-21 + 2μ URA3 RAT8</i>	diese Arbeit
HKY581	<i>MATa his3Δ200 ura3Δ52 leu2 trp1 SUP35::TAP:k.l.URA3</i>	diese Arbeit
HKY582	<i>MATa ura3Δ52 leu2 trp1 SUP35::TAP:k.l.URA3 rat8-2</i>	diese Arbeit
HKY583	<i>MATa ura3 leu2 lys2 ade upf1::kanMX4 sup45-2</i>	diese Arbeit
HKY603	<i>MATa ura3 leu2 lys2 upf1::kanMX4 sup35-21</i>	diese Arbeit
HKY611	<i>MATa ura3 leu2 his3 npl3::kanMX4 rat7-1</i>	diese Arbeit
HKY632	<i>MATa ura3 leu2 trp1 lys2 ade HIS3 + 2μ URA3 SUP35 SUP45</i>	diese Arbeit
HKY678	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 dhh1::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY685	<i>MATa ura3 his3 dhh1::kanMX4 sup45-2</i>	diese Arbeit
HKY688	<i>MATa ura3 leu2 dhh1::kanMX4 sup35-21</i>	diese Arbeit
HKY701	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 fun12::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY705	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 rix1-1</i>	Bassler <i>et al.</i> , 2001

HKY706	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 gbp2::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 NPL3</i>	diese Arbeit
HKY708	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 npl3::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 NPL3</i>	diese Arbeit
HKY712	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 npl3::kanMX4 gbp2::kanMX4 + CEN URA3 NPL3</i>	diese Arbeit
HKY716	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 npl3::kanMX4 gbp2::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 NPL3</i>	diese Arbeit
HKY725	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0 xpo1::kanMX4 + p CEN HIS3 xpo1-1</i>	diese Arbeit
HKY749	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 npl3::kanMX4 fun12::kanMX4 + p CEN URA3 NPL3</i>	diese Arbeit
HKY802	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 RPL25-3xmyc:HIS3MX6</i>	diese Arbeit
HKY805	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 npl3::kanMX4 RPL25-3xmyc:HIS3MX6</i>	diese Arbeit
HKY812	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 lsg1::kanMX4 + p CEN LEU2 lsg1-2</i>	diese Arbeit
HKY816	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 lsg1::kanMX4 + p CEN LEU2 lsg1-3</i>	diese Arbeit
HKY822	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 npl3::kanMX4 xpo1::kanMX4 + p CEN URA3 NPL3 + p CEN HIS3 xpo1-1</i>	diese Arbeit
HKY828	<i>MATa ura3Δ52 ade2Δ101 his3Δ200 rpl10(F85S)</i>	Allan Jacobson
HKY837	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 npl3::kanMX4 lsg1::kanMX4 + p CEN LEU2 lsg1-2 + p CEN URA3 NPL3-myc</i>	diese Arbeit
HKY841	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 npl3::kanMX4 lsg1::kanMX4 + p CEN LEU2 lsg1-3 + p CEN URA3 NPL3-myc</i>	diese Arbeit
HKY854	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 fun12::kanMX4 xpo1::kanMX4 + p CEN HIS3 xpo1-1</i>	diese Arbeit
HKY858	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 rpl10::kanMX4 + p CEN URA3 RPL10-GFP</i>	diese Arbeit
HKY862	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rpl10::kanMX4 + p CEN URA3 rpl10(G161D)-GFP</i>	diese Arbeit
HKY866	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 rpl10::kanMX4 + p CEN LEU2 P_{GAL10}:RPL10-GFP</i>	diese Arbeit
HKY870	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 rpl10::kanMX4 npl3::kanMX4 + p 2μ URA3 NPL3 + p CEN LEU2 P_{GAL10}:RPL10-GFP</i>	diese Arbeit
HKY890	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2 mtr2::HIS3 + p CEN TRP1 mtr2-21 + p CEN URA3 MTR2</i>	Bassler <i>et al.</i> , 2001
HKY892	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2 mtr2::HIS3 + p CEN TRP1 mtr2-33 + p CEN URA3 MTR2</i>	Bassler <i>et al.</i> , 2001
HKY894	<i>MATa ura3 leu2 his3 lys2 trp1 nmd3::kanMX4 + p CEN TRP1 nmd3-2 + p CEN URA3 NMD3</i>	Bassler <i>et al.</i> , 2001
HKY896	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 npl3::kanMX4 mtr2::HIS3 + p CEN TRP1 mtr2-21 + p CEN URA3 MTR2</i>	diese Arbeit
HKY897	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 npl3::kanMX4 mtr2::HIS3 + p CEN TRP1 mtr2-33 + p CEN URA3 MTR2</i>	diese Arbeit
HKY904	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 trp1::kanMX4 npl3::kanMX4 nmd3::kanMX4 + p CEN TRP1 nmd3-2 + p CEN URA3 NMD3</i>	diese Arbeit

HKY906	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 trp1::kanMX4 mtr2::kanMX4 + p CEN TRP1 mtr2-21 + p CEN URA3 MTR2</i>	diese Arbeit
HKY908	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 trp1::kanMX4 mtr2::kanMX4 + p CEN TRP1 mtr2-33 + p CEN URA3 MTR2</i>	diese Arbeit
HKY914	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 lys2Δ0 trp1::kanMX4 nmd3::kanMX4 + p CEN TRP1 nmd3-2 + p CEN URA3 NMD3</i>	diese Arbeit
HKY918	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 trp1::kanMX4 fun12::kanMX4 mtr2::kanMX4 + p CEN TRP1 mtr2-21 + p CEN URA3 MTR2</i>	diese Arbeit
HKY919	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 trp1::kanMX4 fun12::kanMX4 mtr2::kanMX4 + p CEN TRP1 mtr2-33 + p CEN URA3 MTR2</i>	diese Arbeit
HKY922	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 trp1::kanMX4 fun12::kanMX4 nmd3::kanMX4 + p CEN TRP1 nmd3-2 + p CEN URA3 NMD3</i>	diese Arbeit
HKY930	<i>MATa ura3 leu2 his3 ade2 npl3::kanMX4 rpl10(F85S) + CEN URA3 NPL3</i>	diese Arbeit
HKY931	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 trp1::kanMX4</i>	diese Arbeit
HKY934	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 npl3::kanMX4 trp1::kanMX4</i>	diese Arbeit
HKY938	<i>MATa ura3 leu2 his3 rat7-1</i>	diese Arbeit
HKY946	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 sac3::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY951	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 RIX1-GFP:HISMX6</i>	Nissan <i>et al.</i> , 2004
HKY953	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ARX1-TAP:TRP1</i>	Nissan <i>et al.</i> , 2004
HKY970	<i>MATa ura3 leu2 his3 npl3::HIS + CEN LEU2 npl3-26</i>	Heike Krebber
HKY971	<i>MATa ura3 leu2 his3 npl3::HIS + CEN LEU2 npl3-48</i>	Heike Krebber

2.6 Plasmide

Tab. 16: Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmide	Charakterisierung	Referenz/Quelle
pHK12	<i>CEN URA3 pADH:NLS-NES-GFP-GFP</i>	Taura <i>et al.</i> , 1998
pHK20	<i>CEN LEU2 MEX67-GFP</i>	Santos-Rosa <i>et al.</i> , 1998
pHK25	<i>CEN LEU2 NPL3</i>	Heike Krebber
pHK26	<i>CEN URA3 NPL3</i>	Heike Krebber
pHK86	<i>CEN TRP1</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pHK87	<i>CEN LEU2</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pHK88	<i>CEN URA3</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pHK102	<i>2μ TRP1</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pHK103	<i>2μ LEU2</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pHK104	<i>2μ URA3</i>	Christianson <i>et al.</i> , 1992
pHK195	<i>2μ URA3 NPL3</i>	Heike Krebber
pHK260	<i>2μ LEU2 3xmyc-DBP5</i>	Snay-Hodge <i>et al.</i> , 1998
pHK285	<i>2μ LEU2 MTR2</i>	Santos-Rosa <i>et al.</i> , 1998
pHK287	<i>2μ URA3 MTR2</i>	Heike Krebber
pHK418	<i>CEN LEU2 GFP-NPL3</i>	Gilbert <i>et al.</i> , 2001
pHK419	<i>CEN LEU2 GFP-npl3c (npl3-RA8)</i>	Gilbert <i>et al.</i> , 2001
pHK598	<i>2μ LEU2 ADE3 NPL3</i>	Heike Krebber

pHK605	<i>2μ URA3 SUP35 SUP45</i>	Bidou <i>et al.</i> , 2000
pHK606	<i>CEN LEU2 lacZ-(HIV-1 stemloop)-luc</i>	Stahl <i>et al.</i> , 1995
pHK607	<i>CEN LEU2 lacZ-(UAG)-luc</i>	Stahl <i>et al.</i> , 1995
pHK608	<i>CEN LEU2 lacZ-luc</i>	Stahl <i>et al.</i> , 1995
pHK609	<i>CEN LEU2 lacZ-(TY +1 frameshift)-luc</i>	Stahl <i>et al.</i> , 1995
pHK629	<i>2μ URA3 DBP5</i>	Charles N. Cole
pHK630	<i>2μ LEU2 DBP5</i>	Charles N. Cole
pHK636	<i>2μ LEU2 P_{GAL1}3xmyc-DBP5</i>	Heike Krebber
pHK637	<i>2μ TRP1 DBP5</i>	diese Arbeit
pHK648	<i>2μ TRP1 P_{GAL1}3xmyc-DBP5</i>	diese Arbeit
pHK649	<i>2μ URA3 P_{GAL1}3xmyc-DBP5</i>	diese Arbeit
pHK653	<i>CEN URA3 GFP-DBP5</i>	Charles N. Cole
pHK655	<i>CEN URA3 GFP-rat8-2 (dbp5)</i>	Charles N. Cole
pHK657	<i>CEN URA3 P_{GAL1}pgk1_{N103}</i>	Muhlrad <i>et al.</i> , 1995
pHK666	<i>CEN LEU2 GFP-DBP5</i>	Heike Krebber
pHK681	<i>CEN TRP1 P_{ADHI}SUP35-GFP</i>	diese Arbeit
pHK685	<i>CEN TRP1 P_{ADHI}SUP45-GFP</i>	diese Arbeit
pHK688	<i>CEN URA3 NPL3-myc</i>	Shen <i>et al.</i> , 1998
pHK691	<i>2μ LEU2 P_{GAL1}GFP-DBP5</i>	Charles N. Cole
pHK692	<i>2μ LEU2 P_{GAL1}GFP-dbp5(E240Q)</i>	Charles N. Cole
pHK693	<i>CEN LEU2 myc-rat8-2 (dbp5)</i>	Charles N. Cole
pHK695	<i>CEN URA3 P_{GAL1}dbp5(E240Q)-myc</i>	diese Arbeit
pHK697	<i>CEN URA3 RPS2-GFP</i>	Milkereit <i>et al.</i> , 2003
pHK698	<i>CEN URA3 RPL25-GFP</i>	Gadal <i>et al.</i> , 2001
pHK703	<i>CEN URA3 P_{GAL1}DHH1</i>	Coller and Parker, 2005
pHK705	<i>CEN TRP1 mtr2-21</i>	Bassler <i>et al.</i> , 2001
pHK706	<i>CEN TRP1 mtr2-33</i>	Bassler <i>et al.</i> , 2001
pHK708	<i>CEN TRP1 nmd3-2</i>	Bassler <i>et al.</i> , 2001
pHK718	<i>2μ URA3 NMD3</i>	Hedges <i>et al.</i> , 2005
pHK719	<i>2μ LEU2 NMD3</i>	Hedges <i>et al.</i> , 2005
pHK720	<i>CEN LEU2 NMD3-myc</i>	Hedges <i>et al.</i> , 2005
pHK721	<i>CEN LEU2 NMD3-GFP</i>	Hedges <i>et al.</i> , 2005
pHK722	<i>CEN LEU2 lsg1-2</i>	Hedges <i>et al.</i> , 2005
pHK723	<i>CEN LEU2 lsg1-3</i>	Hedges <i>et al.</i> , 2005
pHK724	<i>CEN URA3 NMD3-GFP</i>	Hedges <i>et al.</i> , 2005
pHK739	<i>CEN URA3 RPL25-myc</i>	diese Arbeit
pHK747	<i>CEN URA3 RPL10-GFP</i>	diese Arbeit
pHK756	<i>CEN URA3 rpl10(G161D)-GFP</i>	diese Arbeit
pHK757	<i>CEN TRP1 RPL10-GFP</i>	diese Arbeit
pHK758	<i>CEN TRP1 rpl10(G161D)-GFP</i>	diese Arbeit
pHK765	<i>CEN URA3 GFP-NPL3</i>	diese Arbeit
pHK777	<i>CEN LEU2 6xmyc-NPL3</i>	diese Arbeit
pHK778	<i>CEN LEU2 9xmyc-NPL3</i>	diese Arbeit

pHK779	<i>CEN URA3 9xmyc-NPL3</i>	diese Arbeit
pHK814	<i>CEN TRP1 P_{ADH}npl3-N-GFP (aa1-139)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK815	<i>CEN TRP1 P_{ADH}npl3-C-GFP (aa270-414)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK816	<i>CEN TRP1 P_{ADH}NES-npl3-N-GFP (aa1-139)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK817	<i>CEN TRP1 P_{ADH}NES-npl3-C-GFP (aa270-414)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK818	<i>2μ TRP1 P_{ADH}NES-npl3-N-GFP (aa1-139)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK819	<i>2μ TRP1 P_{ADH}NES-npl3-C-GFP (aa270-414)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK835	<i>CEN LEU2 npl3Δ50 (Δaa365-414)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK836	<i>CEN LEU2 npl3Δ75 (Δaa340-414)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK837	<i>CEN LEU2 npl3Δ100 (Δaa315-414)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK838	<i>CEN LEU2 npl3Δ125 (Δaa290-414)</i>	Claudia Baierlein (AG Krebber)
pHK843	pET-15b HIS-NPL3	diese Arbeit
pHK845	pRSET-C HIS-GFP-NPL3	diese Arbeit
pHK846	pRSET-C HIS-myc-NPL3	diese Arbeit

2.7 Oligonukleotide

Als Startermoleküle für die Polymerase-Kettenreaktionen (siehe 3.1.10 und 3.1.11) wurden die in Tab. 17 aufgeführten Oligonukleotide (Primer) verwendet. Grundsätzlich wurden HPLC-gereinigte Oligonukleotide von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) oder BioSpring (Frankfurt, Deutschland) bezogen.

Tab. 17.: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz
HK300	5'-GGGTGTTCTTCTGGGGC-3'
HK301	5'-CCCAAGATCGAAAATTTACTG-3'
HK393	5'-CCCCCCCCC-3'
HK394	5'-CGACAAGGCTGGTGCTG-3'
HK395	5'-CAACATTTCCGTGTCGCCC-3'
HK396	5'-GCAGAAGTGGTCCTGCG-3'
HK669	5'-GTTTGACCTCAAATCAGGTAGG-3'
HK671	5'-GTGGGCCATTTTGGTAAGC-3'
HK673	5'-GTAACATGACTCTTTAAGGTAGCC-3'
HK696	5'-CCCACAGGCTATAATACTTACCG-3'
HK698	5'-CCAATTCCGGGGTGATAAGC-3'
HK700	5'-CTTTTCTGGCACCTCTAGCC-3'

2.8 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Invitrogen (Frankfurt am Main, Deutschland), NEB (Frankfurt am Main, Deutschland) oder Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

Tab. 18.: Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
RNase A	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>T4</i> DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
Zymolase 100T	Seikagaku Corporation (Tokio, Japan)
<i>SP6</i> RNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
<i>T7</i> RNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.9 Antikörper

Tab. 19.: Antikörper

Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
anti-GFP	Kaninchen	Heike Krebber
anti-GFP (B2)	Maus	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-Hem15p	Kaninchen	Roland Lill
anti-HIS (G18)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-myc (9E10)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-	Kaninchen	Heike Krebber
anti-Npl3p	Kaninchen	Heike Krebber
anti-Por1p	Kaninchen	Roland Lill
anti-Rps3p	Kaninchen	Matthias Seedorf
anti-Sup35p	Kaninchen	David M. Bedwell
anti-Sup45p	Kaninchen	David M. Bedwell
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus-HRP	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Kaninchen-IgG AlexaFluor®488	Ziege	Invitrogen, Frankfurt, Deutschland
anti-Kaninchen-IgG AlexaFluor®594	Ziege	Invitrogen, Frankfurt, Deutschland
anti-Maus-IgG AlexaFluor®488	Ziege	Invitrogen, Frankfurt, Deutschland
anti-Maus-IgG AlexaFluor®594	Ziege	Invitrogen, Frankfurt, Deutschland

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte über ein Mini-Präparations-Protokoll (Birnboim und Doly, 1979). Dafür wurden Submerskulturen in 5 mL LB-Medium mit Zellmaterial einer *E. coli*-Kolonie von LB-Festmedium versetzt und über Nacht (12-16 h; ÜN-Kultur) in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute (Upm) aerob inkubiert. Zelldichten wurden durch Trübungsmessung in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 1 entspricht hierbei einem Titer von ca. 2×10^8 *E. coli*-Zellen/mL. Die ÜN-Kultur wurde zentrifugiert ($3.800 \times g$, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µL Resuspensions-Puffer aufgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 200 µL Lyse-Puffer hinzugegeben, die Proben mehrmals vorsichtig invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 100 µL eiskaltem Neutralisations-Puffer und erneuter Inversion wurden die Proben für 5 min auf Eis inkubiert. Auf diese Weise wurden die durch alkalische Lyse freigesetzten Proteine sowie genomische DNA präzipitiert. Die Zelltrümmer und das Präzipitat wurden durch Zentrifugation sedimentiert ($16.100 \times g$, 5 min, RT). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µL eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt. Nach intensivem Vortexen wurde die wässrige, Plasmid-DNA-enhaltene Phase von der Protein-enhaltenen Phase durch Zentrifugation ($16.100 \times g$, 5 min, RT) separiert und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 800 µL 100% (v/v) Ethanol und anschließender Inkubation für 30-60 min bei -20°C präzipitiert, anschließend durch Zentrifugation ($16.100 \times g$, 15 min, 4°C) sedimentiert und mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation ($16.100 \times g$, 5 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die präzipitierte Plasmid-DNA bei RT getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 50 µL ddH₂O mit 0,5 µg/µL RNase A resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (10-20 µg) allerdings mit einem höheren Reinheitsgrad erfolgte alternativ durch das *GenElute™ Plasmid Miniprep* Kit von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) gemäß des Protokolls des Herstellers. Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im größeren Maßstab (100-200 µg) erfolgte von einer 100 mL ÜN-Kultur mit Hilfe des *NucleoBond® PC 100*

Midi Plasmid DNA Purification Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers. Das erhaltene Plasmid-DNA-Pellet wurde in ddH₂O gelöst, auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt (siehe 3.1.3) und bei -20°C gelagert.

3.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation

Die DNA-Lösung wurde auf 500 µL mit ddH₂O aufgefüllt und mit 500 µL eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt. Nach intensivem Vortexen und anschließender Zentrifugation ($16.100 \times g$, 5 min, RT) wurde die obere wässrige, DNA-enhaltene Phase in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der DNA wurde diese mit 1/10-Volumenanteilen Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 7,0) sowie dem 2,5-fachen Volumen der DNA-Lösung an 100% (v/v) Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation bei -20°C für 30 min wurde die DNA sedimentiert ($16.100 \times g$, 15 min, 4°C), mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert ($16.100 \times g$, 5 min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet bei RT getrocknet, die DNA in 10-50 µL ddH₂O aufgenommen und die Konzentration spektralphotometrisch ermittelt (siehe 3.1.3).

3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch gegen ddH₂O als Referenz mit dem NanoDropTM 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) ermittelt. Nach dem Lambert'schen Gesetz entspricht eine Absorption bei 260 nm von 1 einer Konzentration von 50 µg/µL an DNA oder 40 µg/µL an RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

3.1.4 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA

Eine sequenzspezifische Hydrolyse der DNA (Restriktionsanalyse) erfolgte durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen des Typs II, die DNA sequenzspezifisch an Palindromen schneiden. Dafür wurde die gewünschte DNA-Menge mit den vom Hersteller empfohlenen Einheiten an Restriktionsendonukleasen sowie mit dem für das Enzym entsprechenden Reaktionspuffer zusammengegeben. Für analytische Reaktionsansätze wurden bis zu 2 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µL eingesetzt. Für präparative Reaktionsansätze wurden bis zu 10 µg DNA in einem Volumen von bis zu 100 µL eingesetzt und die Volumina der restlichen Komponenten des Reaktionsansatzes entsprechend der DNA-Menge angeglichen.

3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese unter Nutzung des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid durchgeführt (Sharp *et al.*, 1973). Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 254 nm (Kemp *et al.*, 1989). Bei der Gelelektrophorese werden die negativ geladenen Makromoleküle, in diesem Fall die DNA-Fragmente, in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Mobilität, die proportional zum Ladungs-Massen-Verhältnis der Makromoleküle ist, separiert. In Abhängigkeit der erwarteten Größen der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-2% (w/v) TAE-Agarosegele mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid verwendet. Als Laufpuffer wurde 1× TAE benutzt. Die zu analysierenden DNA-Lösungen wurden mit 1/5-Volumenanteilen von 6× DNA-Probenpuffer versetzt und bei 10 V/cm² für 30-60 min aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Leuchttisch visualisiert, mittels einer Videokamera mit angeschlossenem Drucker dokumentiert und deren Größe anhand eines DNA-Größenstandards (*GeneRuler*[™] 100bp DNA-Marker oder Lambda-DNA *EcoRI*+*HindIII* Marker (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) bestimmt bzw. kontrolliert.

3.1.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Reinigung eines zur Klonierung verwendeten DNA-Fragments mit bestimmter Größe wurde die gelelektrophoretische Auftrennung genutzt (siehe 3.1.5). Diese Auftrennung erfolgte solange, bis das gewünschte DNA-Fragment deutlich separiert war. Anschließend wurde das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des *NucleoSpin*[®] *Extract 2 in 1* Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers extrahiert und gereinigt. Die Aufreinigung von linearisierter Plasmid-DNA erfolgte ohne Verwendung der Agarosegelelektrophorese direkt mit dem *NucleoSpin*[®] *Extract 2 in 1* Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland).

3.1.7 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Fragmentenden

Um die mögliche Religation von hydrolytisch gespaltener Plasmid-DNA zu minimieren, wurde eine alkalische Phosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) verwendet, welche die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Zu dem Reaktionsansatz der Restriktionsanalyse (siehe 3.1.4) wurden 1-2 U des Enzyms CIAP entsprechend den Herstellerangaben hinzugegeben und bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die

CIAP wieder aus dem Reaktionsansatz entfernt oder hitzeinaktiviert (15 min, 85°C), um eine spätere Dephosphorylierung der 5'-Insertenden im Ligationsansatz zu verhindern.

3.1.8 Generierung von glatten DNA-Fragmentenden

Zur Herstellung von glatten (*blunt*) DNA-Enden wurde das große Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*, das sogenannte Klenow-Fragment, verwendet. Dabei wurden den Reaktionsansätzen mit linearisierten DNA-Fragmenten (siehe 3.1.4), die nicht-kompatibel überhängende (*sticky*) Enden besaßen, 2-5 U Klenow-Fragment und 1 µL eines Nukleotid-Mixes (50 µM Endkonzentration je dNTP) hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt. Dies erfolgte entweder durch die Zugabe von 1 µL Na₂-EDTA (0,5 M) oder über eine Inkubation der Reaktionsansätze für 10 min bei 75°C.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten über Phosphodiesterbindungen mit kompatibel überhängenden oder glatten Enden wurden das zu inserierende DNA-Fragment sowie 50-100 ng des restringierten Plasmids in einem molarem Verhältnis von 2:1 bzw. 4:1 zusammengegeben und durch das Enzym T4 DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden. Die einzusetzende Menge des zu inserierenden DNA-Fragmentes berechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Menge des Plasmids [ng]} \times \text{Größe des Fragments [kB]}}{\text{Größe des Plasmids [kB]}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Fragment}}{\text{Plasmid}} = \text{Menge des Inserts [ng]}$$

Dem Ligationsansatz wurden 2-5 U der T4 DNA-Ligase mit dem entsprechenden Ligasepuffer zugesetzt. Bei Ligationen von glatten Enden wurde dem Ansatz zusätzlich 1 µL 50% (w/v) PEG 4000 zugegeben. Parallel wurden zwei Kontrollansätze zusammengestellt, in denen entweder das Insertions- oder das Vektorfragment durch ddH₂O ersetzt wurde. Die Inkubation der Ligations- und Kontrollansätze erfolgte für 2-4 h bei 25°C oder für 12-16 h bei 16°C. Nach der Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen mit dem gesamten Ligationsansatz (siehe 3.1.12) wurden diese auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C für 12-16 h inkubiert. Die Zahl der gewachsenen Kolonien der Kontrollansätze lieferte Informationen über das Maß der Religation des Vektors und einer möglichen Verunreinigung des Inserts.

3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine sensitive Methode zur *in vitro* Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes (Saiki *et al.*, 1988). Dabei katalysiert die hitzestabile Taq DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Chien *et al.*, 1976) die Synthese des neuen, komplementären DNA-Stranges ausgehend von einem synthetisierten Oligonukleotid (Primer) in 5'-3'-Richtung über eine Primerverlängerung bis zum anderen Primer. Mit Hilfe dieser Methode konnten zum einen Plasmide oder genomische DNA (gDNA) überprüft bzw. DNA-Fragmente für Klonierungszwecke amplifiziert werden. Zum anderen konnten mit Hilfe des *QuikChange[®] XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) Punktmutationen oder Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in die entstehenden DNA-Fragmente nach Anweisungen des Herstellers eingeführt werden.

Anteil	Materialien
1×	Taq DNA-Polymerase-Puffer (10×, NEB)
3 μM	Primermix (forward und reverse, je 100 pmol/μL)
200 μM	je dNTP (10 mM)
2,5-5 U	Taq DNA-Polymerase (5 U/μL, NEB)

Die PCR-Reaktionsmischung mit einem Gesamtvolumen von 25-100 μL wurde für alle Proben angesetzt und aufgeteilt. Zu jedem Ansatz mit Ausnahme der Negativkontrolle wurde die entsprechende Menge an DNA (1 μL gDNA (~50-200 ng), Plasmid-DNA (10-100 ng) oder *E. coli*-Zellen für Kolonie-PCR) gegeben und die PCR mit folgendem Programm im PCR-Gerät gestartet:

Initiale Denaturierungsphase	1 Zyklus	95°C für 3-5 min
Zyklische Denaturierungsphase	25-40 Zyklen	95°C für 1 min
Zyklische Hybridisierungsphase		50-60°C für 1 min (je nach Schmelztemperatur der Primer)
Zyklische Elongationsphase		72°C für 1 min pro kb PCR-Produkt
Terminale Elongationsphase	1 Zyklus	72°C für 10 min

Die PCR-Proben wurden nach der PCR gelelektrophoretisch getrennt (siehe 3.1.5).

3.1.11 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)

Für den semi-quantitativen Nachweis spezifischer mRNA's wurde das auf reverser Transkription mit anschließender Amplifizierung basierende *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Pro Reaktions-

ansatz wurden 0,5-2 µg isolierte Gesamt-RNA und für die jeweilige mRNA spezifische Oligonukleotide verwendet. Nach einer spezifischen mRNA-abhängigen Anzahl an Zyklen (25-40) wurden 15 µL vom PCR-Ansatz entnommen, auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.1.5) und quantitativ durch die Software Image Gauge 3.1 (Fuji Film, Düsseldorf, Deutschland) ausgewertet.

3.1.11 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die zu transformierende Plasmid-DNA (siehe 3.1.1) oder der Ligationsansatz (siehe 3.1.9) wurde mit 50-100 µL auf Eis aufgetauten, chemokompetenten *E. coli*-Zellen vorsichtig gemischt (Ausubel *et al.*, 1994). Nach einer Inkubation für 20-30 min auf Eis wurde die Plasmid-DNA über Hitzeschock (2 min, 42°C) in die Zellen eingebracht. Unmittelbar nach dem Hitzeschock wurde den Transformationsansätzen jeweils 1 mL LB-Flüssigmedium zugegeben. Die Transformationsansätze wurden anschließend 1-2 h bei 37°C inkubiert. Durch eine Zentrifugation (600 × g, 5 min, RT) wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand bis auf 100 µL Restmedium verworfen. In der verbleibenden Restflüssigkeit wurde das Pellet resuspendiert. Bei Ligationsansätzen wurde die gesamte Zellsuspension auf LB-Festmedium, welches das zur Selektion benötigte Antibiotika enthielt, mit einem Drigalskispatel ausplattiert und über Nacht (12-16 h) bei 37°C inkubiert. Sofern die Transformation der reinen Vervielfältigung des Plasmides diene, wurden 90 µL des Ansatzes in 100 mL LB-Flüssigmedium für eine anschließende Plasmidpräparation überführt. Die restlichen 10 µL wurden in 90 µL LB-Flüssigmedium resuspendiert, auf selektivem LB-Festmedium ausplattiert und über Nacht (12-16 h) bei 37°C inkubiert (siehe 3.1.1).

3.1.11 *In vitro* Transkription

Zur Herstellung von *in vitro* transkribierter rRNA für die *in vitro* RNA Ko-Immunpräzipitationen (siehe 3.3.11) wurden die Plasmide zunächst mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert (siehe 3.1.4). Die Aufreinigung der linearisierten Plasmid-DNA erfolgte mit dem *NucleoSpin® Extract 2 in 1* Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Zur Transkription der rRNA-Fragmente wurde linearisierte Plasmid-DNA verwendet. Die DNA-abhängige *T7* bzw. *SP6* RNA-Polymerase beendet am 5'-Ende des Matrizenstranges die RNA-Synthese. Sie benötigen dafür Ribonukleosidtriphosphate, bivalente Kationen und eine DNA-Matrize mit einem spezifischen *T7* bzw. *SP6* Promotor (Chamberlin und Ring, 1973; Melton *et al.*, 1984). Der 100 µL *in vitro* Transkriptionsansatz enthielt 2 µg restringierte Plasmid-DNA, die

Ribonukleosidtriphosphate ATP, CTP, GTP und UTP (je 10 mM) in einer Endkonzentration von 2 mM, 125 U RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) (50 U/μL) und 90 U T7 bzw. SP6 RNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in 1× *in vitro* Transkriptionspuffer. Der Ansatz wurde mit ddH₂O_{DEPC} auf 100 μL aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 4 μL 0,5 M EDTA (pH 8.0) wurde die Reaktion gestoppt. Zur Reinigung der Transkripte wurde die DNA mit 20 U DNase I/ RNase frei (10 U/μL; 2 U/μg DNA-Matrize) hydrolysiert (20-30 min, 37°C) und der Ansatz einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und mit Ethanol gefällt (siehe 3.1.2). Anschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 3.1.3).

3.2 Methoden mit *S. cerevisiae*

3.2.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Das Zellmaterial von Hefestämmen wurde aus bei -80°C gelagerten Gefrierkulturen entnommen und auf YPD-Medium oder Selektionsmedium ausgestrichen. Die anschließende Inkubationsdauer bei 25°C richtete sich nach der Wachstumsrate des jeweiligen Hefestamms und lag zwischen 2 bis 5 Tagen. Flüssigkulturen wurden mit Einzelkolonien von Agarplatten oder mit Teilen einer Vorkultur versetzt und je nach Verwendungszweck bis zu 3 Tage bei 25°C inkubiert. Kulturvolumina bis zu 25 mL wurden auf einem Kulturröhrchenrotator, größere Volumina in Erlenmeyerkolben in einem Schüttelinkubator bei 180 Upm inkubiert. Die Zelldichten wurden durch Auszählen mit einem Hämazytometer oder durch Trübungsmessung in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Diese Inkubationsdauer betrug mindestens 3 Tage. Für Gefrierkulturen wurden auf Agarplatten frisch gewachsene Zellen in 50% (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Wachstumsanalyse von *S. cerevisiae*

Zur Analyse und zum Vergleich des Wachstums von verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen wurden entweder auf Agarplatten oder über Nacht in Flüssigkulturen gewachsene Hefezellen verwendet. Von einer seriellen Verdünnung, ausgehend von 1×10^5 Zellen in 10-20 μL, wurden zusätzlich weitere vier 1:10 Verdünnungen auf Agarplatten des gewünschten Voll- oder Selektionsmediums getropft. Die Inkubation erfolgte für 2-6 Tage unter den im jeweiligen Experiment angegebenen Bedingungen.

3.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Eine 10 mL-Flüssigkultur von sich in der stationären Phase befindenden Hefezellen ($1-3 \times 10^8$ Zellen/mL) wurde durch Zentrifugation ($2.500 \times g$, 5 min, RT) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 mL ddH₂O resuspendiert, in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit einem Schraubverschluss überführt und erneut zentrifugiert ($16.100 \times g$, 2 min, RT). Das Pellet wurde bei -20°C gelagert oder direkt in 200 µL Detergenz-Lyse-Puffer aufgenommen und gevortext. Nach Zugabe von 300 µL Glasperlen und 200 µL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) erfolgte der chemische und mechanische Aufschluss (FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) 4,5 m/s, 20 s) der Hefezellen. Nach Zugabe von 200 µL TE-Puffer und kurzem Vortexen wurden die Phasen durch Zentrifugation separiert ($16.100 \times g$, 5 min, RT). Die obere wässrige Phase, in der sich die gereinigte chromosomale DNA befand, wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 6 µL Ammoniumacetat (7,5 M) sowie 1 mL 100% (v/v) Ethanol bei -20°C für 30-60 min präzipitiert. Nach einer erneuten Zentrifugation ($16.100 \times g$, 15 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 mL 70% (v/v) Ethanol gewaschen und zentrifugiert ($16.100 \times g$, 5 min, 4°C). Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, das Pellet bei RT getrocknet und in 50 µL TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung der chromosomalen DNA erfolgte bei -20°C.

3.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae*

Zur chemischen Inaktivierung der Ribonukleasen wurden die für die Arbeiten mit RNA verwendeten Lösungen und Puffer mit dem alkylierend wirkenden Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert. Die Extraktion von Gesamt-RNA aus sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Hefezellen ($1-3 \times 10^7$ Zellen/mL) erfolgte mittels der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Methode unter Verwendung von peqGOLD RNAPure™ nach dem Protokoll des Herstellers. Der Aufschluss der Zellen und die Freisetzung der RNA erfolgte mit Hilfe von Glasperlen und mechanischem Vortexen (FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) 4,5 m/s, 20 s). Mit 20 U RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde die RNA in 50 µL ddH₂O_{DEPC} gelöst und bis zur späteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentration der RNA wurde spektralphotometrisch gegen ddH₂O_{DEPC} als Referenz ermittelt (siehe 3.1.3).

3.2.5 Plasmid-Extraktion aus *S. cerevisiae*

Um Plasmide aus Hefezellen zu isolieren, wurden in der stationären Phase befindliche Hefezellen ($1-3 \times 10^8$ Zellen/mL) einer 10 mL-Flüssigkultur durch Zentrifugation ($2.500 \times g$, 5 min, RT) sedimentiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 mL ddH₂O resuspendiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit einem Schraubverschluss überführt. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert ($16.100 \times g$, 1 min, RT), der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -20°C gelagert oder direkt in 300 µL Cracking-Puffer aufgenommen. Nach kurzem Vortexen wurden 300 µL Glasperlen und 400 µL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zu den Reaktionsansätzen gegeben. Dem chemischen und mechanischen Aufschluss der Zellen (FastPrep[®]-24 (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) 4,5 m/s, 20 s) folgte zur Phasentrennung eine Zentrifugation ($16.100 \times g$, 5 min, RT). Die obere wässrige Phase, in der sich die Plasmid-DNA befand, wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 mL 100% (v/v) Ethanol wurde die Plasmid-DNA präzipitiert und nach einer Inkubation von 30-60 min bei -20°C durch Zentrifugation sedimentiert ($16.100 \times g$, 15 min, 4°C). Nach einem Waschschrift mit 1 mL 70% (v/v) Ethanol und anschließender Zentrifugation ($16.100 \times g$, 5 min, 4°C) wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 50 µL ddH₂O resuspendiert.

3.2.6 Transformation von *S. cerevisiae*

Für Transformationen wurden kompetente Hefezellen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ($1-3 \times 10^7$ Zellen/mL). Die Kulturen wurden zentrifugiert ($2.500 \times g$, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit 1 mL TE/LiOAc gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit TE/LiOAc auf eine Zelldichte von 1×10^9 Zellen/mL eingestellt. Für einen Transformationsansatz wurden 50 µL der Zellsuspension, 1 µg Plasmid-DNA und 50 µg Lachssperma DNA (ssDNA), als Träger der Plasmid-DNA verwendet. Die ssDNA wurde vor der Benutzung 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden dem Transformationsansatz 350 µL PEG4000/TE/LiOAc hinzugefügt. Nach intensivem Vortexen anschließender Inkubation für 30-90 min bei 25°C auf einem Kulturröhrchenrotator, erfolgte der Hitzeschock für 15 min bei 42°C. Durch Zentrifugation ($16.100 \times g$, 1 min, RT) wurden die Zellen sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 1 mL ddH₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde nach erneuter Zentrifugation ($16.100 \times g$, 1 min, RT) in 100 µL ddH₂O resuspendiert und die Zellsuspension anschließend auf dem entsprechenden Selektionsfestmedium ausplattiert.

3.2.7 Herstellung von *S. cerevisiae*-Stämmen

3.2.7.1 Sporulation und Tetradendissektion

Zur meiotischen Vermehrung wurden zunächst zwei haploide Hefestämme mit unterschiedlichen Paarungstypen, den sogenannten Mating-Typen *MAT_a* und *MAT_α*, gekreuzt, damit diese zu Gameten zu differenzieren und anschließend eine Zygote bilden (Rose *et al.*, 1990). Die Zygote bildet nach der Meiose einen Askus, der als Tetrade bezeichnet wird und aus vier haploiden Sporen besteht, welche durch Mikromanipulation voneinander separiert werden können. Bei der Kreuzung von zwei haploiden Hefestämmen wurden die Hefezellen auf YPD-Festmedium separat, aber auch miteinander vermischt ausgestrichen und für 1-2 Tage bei 25°C inkubiert. Bei der Auswahl der Ausgangsstämme wurde darauf geachtet, dass sie sich nicht nur im jeweiligen Paarungstyp, sondern auch, wenn möglich, in dem entsprechenden Genotyp in mindestens zwei Selektionsmarkern voneinander unterschieden. Zur Anreicherung von diploiden Zellen wurden diese dann auf Selektionsfestmedium, auf dem haploide Zellen aufgrund des Selektionsdruckes nicht wachsen konnten, durch Umstempeln transferiert. Wenn die Selektion der diploiden Hefezellen, aufgrund von fehlenden Selektionsmarkern, nicht möglich war, wurden durch Transformationen von Plasmiden (siehe 3.2.6) zusätzliche Selektionsmarker in die Hefestämme eingebracht. Die diploiden Hefezellen wurden zur Einleitung der Sporulation in 2 mL Sporulationsmedium überführt und für mindestens 3 Tage bei 25°C auf einem Kulturröhrchenrotator inkubiert. Das Ausmaß der Askusbildung wurde lichtmikroskopisch überprüft. Zur Separierung der Sporen wurden 50 µL Zellsuspension mittels Zentrifugation ($16.100 \times g$, 1 min, RT) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µL P-Lösung resuspendiert. Durch Zugabe von 1-5 U Zymolase wurden die von einer Askuswand umgebenen Tetradensporen enzymatisch freigesetzt. Diese lagen anschließend in einer sphäroblastischen Form vor. Die enzymatische Lyse wurde lichtmikroskopisch überprüft und erfolgte für 5-30 min bis die vier zusammenhängenden Sporen deutlich sichtbar von der Askuswand gelöst waren. Die Zellen wurden zentrifugiert ($16.100 \times g$, 15 s, RT) und mit 1 mL P-Lösung gewaschen, um die zymolasehaltigen Reste zu entfernen und erneut zentrifugiert ($16.100 \times g$, 15 s, RT), bevor das Zellpellet in 1,5 mL P-Lösung resuspendiert wurde. Aus dieser Zellsuspension wurden 50 µL entnommen und in Form einer geraden Linie auf YPD-Festmedium aufgetragen. Durch eine Glasnadel, die über einen am Dissektionsmikroskop befestigten Mikromanipulator bewegt wurde, konnten die Askussporen einer Tetrade getrennt und mit Hilfe eines Koordinatensystems auf dem YPD-Festmedium angeordnet und abgelegt werden. Der Genotyp der gewachsenen Sporen

wurde anschließend auf verschiedenen Selektionsfestmedien analysiert. Des Weiteren wurden der Paarungstyp bestimmt und phänotypisch detektierbare Mutationen, wie Temperatursensitivität oder Farbe, untersucht. Dazu wurde das Zellmaterial von zuvor getrennten und auf YPD-Festmedium gewachsenen Tetradensporen in jeweils 100 µL 50% (v/v) Glycerin resuspendiert und auf die verschiedenen Festmedien überführt. Die Aufbewahrung der einzelnen haploiden Hefestämme erfolgte in 96-Loch-Platten bei -80°C.

3.2.7.2 *In vivo* Epitop-Tagging von Proteinen

Das *in vivo* Epitop-Tagging (Knop *et al.*, 1999) erfolgte mittels homologer Rekombination eines über PCR amplifizierten und durch Transformation in Hefezellen eingebrachten DNA-Fragmentes (siehe 3.2.6), welches sich auf Grund homologer DNA-Abschnitte in den spezifischen genomischen DNA-Abschnitt von Hefezellen inserierte. Dabei wurde der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) eines Gens am 3'-Ende mit einer für einen Anhang (*Tag*) kodierenden Sequenz fusioniert. Die gewünschte Sequenz wurde zusammen mit der Markerkassette durch eine PCR, ausgehend von einem Plasmid, amplifiziert (siehe 3.1.10) und aufgereinigt (siehe 3.1.2). Die 5'-Enden der Primer wurden so gewählt, dass sie homologe Sequenzen (ca. 40 Nukleotide) zu der gewünschten Zielsequenz im Hefegenom enthielten, jedoch nicht das Stopp-Kodon besaßen. So wurde bei der späteren homologen Rekombination das Stopp-Kodon des Gens entfernt und der Anhang bei der Translation mit synthetisiert. Nach der Transformation von 2-10 µg des PCR-Produktes und anschließender zielgerichteter Integration in die gDNA erfolgte die Selektion der Hefezellen durch die Resistenz-vermittelnde Markerkassette auf Festmedium.

3.2.8 Dualer Luziferasereporterversuch

Um den Einfluss bestimmter Proteine auf das *Recoding*, wie die Nutzung eines alternativen Leserasters, die Auflösung von Sekundärstrukturen bzw. die Erkennung eines Stopp-Kodons zu untersuchen, wurden duale Luziferasereporterversuche durchgeführt (Stahl *et al.*, 1995; Harger *et al.*, 2003). Dabei wurde ein hybrides Expressionskonstrukt verwendet, das einen, durch *SV-40*-Promotor induzierbaren ORF besitzt. Der ORF besteht aus einer Fusion von einem, für die β -Galaktosidase kodierenden, *lacZ*-Gen und dem Luziferase exprimierenden *luc*-Gen. Zwischen den beiden Genen wurde eine Zielsequenz (Stopp-Kodon, Haarnadelstruktur (*Stem-Loop*) oder +1 *Frameshift*) inseriert, so dass das Luziferasegen nur bei einem Überlesen der inserierten Sequenz exprimiert wird. Die Luziferase ist eine Oxygenase, die in Gegenwart der Kofaktoren ATP, Mg^{2+} und

Koenzym A das Substrat Luziferin mit molekularem Sauerstoff zu Oxyluziferin oxidiert. Die bei dieser Reaktion entstehende Emission mit einer Wellenlänge von 562 nm kann mit einem Luminometer quantifiziert werden. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde für eine Normalisierung der Luziferaseaktivität als interne Referenz verwendet, um die Expressionsmenge der hybriden mRNA und der daraus folgenden Proteinsynthese in den verwendeten Hefestämmen anzugleichen und auftretende experimentelle Schwankungen zu minimieren. Dafür wurden die β -Galaktosidaseeinheiten der verwendeten Hefestämme mit den unterschiedlichen Konstrukten gleichgesetzt.

Für die Analyse des Luziferasereporters wurden 20-50 OD_{600 nm} von einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Hefekultur ($1-3 \times 10^7$ Zellen/mL) zentrifugiert ($2.000 \times g$, 5 min, 4°C), in 1 mL 1× PBS mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert, anschließend in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit einem Schraubverschluss überführt und erneut zentrifugiert ($16.100 \times g$, 2 min, 4°C). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden dem Zellpellet 10 μ L Proteaseinhibitor (*Protease Inhibitor Cocktail for use with fungal and yeast extracts* (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)), 300 μ L Glasperlen und 400 μ L 1× PBS mit 1 mM PMSF hinzugegeben. Nachdem die Hefezellen mechanisch aufgeschlossen wurden (FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) 4,5 m/s, 20 s), folgte eine Zentrifugation ($16.100 \times g$, 2 min, 4°C), so dass zu 360 μ L Luziferase-Reaktionspuffer je 100 μ L, des vom Zelltrümmer befreiten Überstandes, in ein Messröhrchen gegeben wurde. Die Messung jeder Probe erfolgte in Triplikaten in dem AutoLumat Plus LB 953 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland), der automatisch 100 μ L der Luziferinlösung auf die Proben gegeben und die Luziferaseaktivität gemessen hat. Für die Messung der β -Galaktosidaseaktivität wurden 20-50 OD_{600 nm} von logarithmisch wachsenden Hefezellen ($1-3 \times 10^7$ Zellen/mL) zentrifugiert ($2.000 \times g$, 5 min, 4°C), in 1 mL eiskaltem Z-Puffer gewaschen und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Hefezellen wurden nach einer weiteren Zentrifugation ($16.100 \times g$, 2 min, 4°C) in 300 μ L eiskaltem Z-Puffer aufgenommen. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese zunächst 30 s in flüssigem Stickstoff und anschließend 1-2 min in einem 37°C Wasserbad inkubiert, bis das Zelllysate aufgetaut war. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Ablaufs wurden jedem Ansatz 700 μ L Z-Puffer mit 0,35 M β -Mercaptoethanol und 160 μ L Z-Puffer mit 0,015 M o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) zugegeben und bei 37°C inkubiert. Die durch die β -Galaktosidase katalysierte Umsetzung des ONPG wurde durch eine Gelbfärbung sichtbar und nach einer bestimmten Inkubationszeit, abhängig von den

verwendeten Hefestämmen, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,4 mL 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Die Proben wurden nach kurzer Zentrifugation (16.100 × g, 2 min, RT) im Spektralphotometer bei einer Absorption von 420 nm gemessen. Als Referenzwert diente ein Ansatz ohne Hefezellen. Die β-Galaktosidaseeinheiten wurden nach folgender Formel berechnet und für die Normalisierung der Luziferaseaktivitäten verwendet:

$$\frac{1000 \times A(420 \text{ nm})}{\text{Zeit [min]} \times \text{Volumen der Kultur [mL]} \times OD(600 \text{ nm})} = \beta\text{-Galaktosidaseeinheiten}$$

3.2.9 *In vivo* Translationsversuch

Zur Bestimmung der Translationsrate und Neusynthese von Proteinen wurden Hefezellen mit radioaktiv-markiertem Methionin und Cystein inkubiert, die in die Proteine während der Translation eingebaut wurden. Diese markierten und neusynthetisierten Proteine wurden im Anschluss über Autoradiographie detektiert.

Dazu wurden Hefezellen in Selektionsmedium, das kein Methionin enthielt, bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden $2,5\text{-}5 \times 10^8$ Hefezellen aus der logarithmischen Wachstumsphase ($1\text{-}3 \times 10^7$ Zellen/mL) zentrifugiert (2.000 × g, 5 min, 4°C), in 1 mL Medium resuspendiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit einem Schraubverschluss überführt. Nach einer Vorinkubation (10, 30 oder 60 min bei 25°C oder 37°C) wurde die Zellsuspension mit 200 µCi radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Methionin und -Cystein (*Redivue Promix [³⁵S]-Cys/Met* (GE Healthcare, München, Deutschland)) für 5-10 min inkubiert. Nach der Zentrifugation (16.100 × g, 2 min, RT) wurden die Zellen zweimal mit 1 mL ddH₂O gewaschen und anschließend in 200 µL 1× SDS-Probenauflösungspuffer aufgenommen und aufgeschlossen (siehe 3.3.1). Die radioaktiv-markierten Proteine wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (siehe 3.3.4). Als Ladungskontrolle wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt (siehe 3.3.5). Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel mit dem *Gel-Drying-Kit* getrocknet (Promega, Mannheim, Deutschland), die radioaktiv-markierten Proteine durch Autoradiographie mit Hilfe des PhosphorImager System FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) detektiert und durch Verwendung der Software Image Gauge 3.1 quantifiziert. Die Aufnahme des radioaktiv-markierten [³⁵S]-Methionins und -Cysteins in die Hefezellen wurde durch Messung der Radioaktivität des Zellpellets mit Hilfe des Szintillationszählers LS1701 (Beckmann, München, Deutschland) bestimmt.

3.2.10 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Zur Überprüfung der Ko-Sedimentation bestimmter Proteine mit aktiven Translationskomplexen wurde eine subzelluläre Fraktionierung mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, mit Hilfe des programmierbaren Dichtegradient-Fraktionators DGF (Teledyne Isco Inc., Lincoln, Nebraska, USA) durchgeführt. Bei dieser Methode werden Zellhomogenisate nach Ultrazentrifugation von einem Saccharosegradienten in ihre subzellulären Komponenten fraktioniert und analysiert (Frey *et al.*, 2001).

Dazu wurde eine über Nacht (12-16 h) angezogene 100 mL Hefekultur, die sich in der frühen logarithmischen Wachstumsphase befand ($OD_{600\text{ nm}}$ 0,5-0,8), mit 100 μM Cycloheximid 10 min auf Eiswasser inkubiert (alternativ 15 min bei 25°C) und anschließend zentrifugiert ($2.500 \times g$, 5 min, RT). Das Antibiotikum Cycloheximid führt zu einer Inhibierung der ribosomalen Peptidyltransferaseaktivität und somit zu einer Arretierung translatierender Ribosomen auf den mRNA-Molekülen. Eine Zellmenge von 50 $OD_{600\text{ nm}}$ wurde durch Zentrifugation ($2.500 \times g$, 5 min, RT) pelletiert und in ein 15 mL Reaktionsgefäß mit 500 μL Gradienten-Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 μL Proteaseinhibitor (*Complete EDTA-free* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)), 20 μL Proteaseinhibitor (*Protease Inhibitor Cocktail for use with fungal and yeast extracts* (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)) und 300 μL Glasperlen erfolgte der Zellaufschluss durch intensives Vortexen (30 s, 4°C) und anschließender Inkubation auf Eis (30 s). Dieser Vorgang wurde sechs- bis achtmal wiederholt. Das Homogenisat wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation ($1.200 \times g$, 2 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert ($6.000 \times g$, 20 min, 4°C). Anschließend wurden 7,5 oder 10 OD des Zelllysates auf einen linearen, sich in einem Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (Beckmann 14 \times 95 mm für Rotortyp SW40 oder 14 \times 89 mm für Rotortyp SW41) befindenden, 11-12 mL Saccharose-Dichtegradienten vorsichtig aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation (Beckman Ultrazentrifuge, Krefeld, Deutschland), bei dem eine Trennung der ribosomalen Untereinheiten von den schneller in den Gradienten einlaufenden Mono- und Polysomen stattfand. Die Prozentigkeiten der Gradienten sowie die Dauer der Ultrazentrifugation wurden den experimentellen Zielstellungen angepasst. Während der Auftrennung des Gradienten in Fraktionen mit einem Volumen von 600 μL wurde von einem Durchflussphotometer kontinuierlich die Absorption bei 254 nm aufgezeichnet. Dies ermöglichte Angaben über die Verteilung der rRNA enthaltenen Ribosomen im Gradienten. Die Proteine in den Fraktionen wurden

durch Präzipitation gereinigt (siehe 3.3.2). Im Anschluss wurde das Pellet in 50 µL 1× SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.4) und Western Blot (siehe 3.3.6) mit Immundetektion analysiert (siehe 3.3.6).

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Lyse von *S. cerevisiae* und Proteinextraktion

Für Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden $2,5 \times 10^8$ Hefezellen mit einer Zelldichte von $1-3 \times 10^7$ Zellen/mL aufgeschlossen (Horvath und Riezman, 1994). Die logarithmisch wachsenden Hefezellen wurden sedimentiert ($2.000 \times g$, 5 min, 4°C), anschließend in 1 mL H₂O gewaschen und in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit einem Schraubverschluss überführt. Nach einer erneuten Zentrifugation ($16.100 \times g$, 1 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -20°C gelagert oder auf Eis direkt mit 5 µL Proteaseinhibitor (*Protease Inhibitor Cocktail for use with fungal and yeast extracts* (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)), 100 µL Glasperlen und 200 µL 1× SDS-Probenauftragspuffer je 100 µL Zellpellet versetzt. Die Hefezellen wurden nach kurzem, intensivem Vortexen mechanisch aufgeschlossen (FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) 4,5 m/s, 20 s). Zelltrümmer und Glasperlen wurden durch Zentrifugation sedimentiert ($16.100 \times g$, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 3.3.4) gelagert.

3.3.2 Präzipitation von Proteinen

Zur Reinigung und Konzentrierung von Proteinen für eine anschließende Analyse mittels SDS-PAGE wurde eine Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt (Bensadoun und Weinstein, 1976). Dazu wurden die Proben mit einem Volumenanteil 20% (v/v) TCA versetzt und für mindestens 1 h auf Eis oder über Nacht (12-16 h) bei 4°C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation ($16.100 \times g$, 30 min, 4°C) sedimentiert, zweimal mit 1 mL 80% (v/v) Aceton gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 1× SDS-Probenauftragspuffer aufgenommen.

3.3.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Die photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte unter Verwendung des RC DC Protein Assay-Systems von Bio-Rad (München, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers und basiert auf der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Die

Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe dieses Systems ist unempfindlich gegenüber reduzierenden Substanzen und Detergentien und ermöglichte eine Quantifizierung der Proteine, wenn diese in SDS-Probenaufragspuffer gelöst vorlagen.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung proteinhaltiger Proben erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), in der Proteine unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach separiert werden (Laemmli, 1970). Die Proteine oder Proteinkomplexe werden durch Aufkochen in Anwesenheit von reduzierenden Agenzien, wie 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), denaturiert. Die aufgrund ihrer Ladung unterschiedlichen Proteine werden durch das im Gel, Probenaufrags- und Laufpuffer enthaltene Detergenz Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfat*, SDS), das negativ geladen ist, gebunden. Somit besitzen alle Proteine im Gel eine überwiegend negative Ladung. Demnach werden die Proteine aufgrund des Ladungs-Massen-Verhältnisses anhand ihrer Größe im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die SDS-Polyacrylamidgele mit einer Größe von 10×18 cm setzten sich aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammen. Die Prozentigkeit des Trenngels richtete sich nach der Größe der nachzuweisenden Proteine. Das Trenngel hatte dementsprechend einen Acrylamid/Bisacrylamid-Gehalt von 10% (v/v), 12% (v/v) oder 15% (v/v), wohingegen das Sammelgel einen Acrylamid/Bisacrylamid-Gehalt von 4% (v/v) aufwies. Die in SDS-Probenaufragspuffer gelösten Proteine wurden durch eine Inkubation für 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend kurz zentrifugiert ($16.100 \times g$, 1 min, 4°C) und zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder oder PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)) auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelapparaturen, wobei der SDS-Elektrophoreselaufpuffer sowohl als Anoden- als auch Kathodenpuffer benutzt wurde. Beim Durchlaufen des Sammelgels wurde eine konstante Stromstärke von 25 mA und nach Erreichen des Trenngeles eine von 35 mA für 2-5 h angelegt. Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine durch eine Coomassie-Färbung analysiert (siehe 3.3.5) oder mittels Western Blot auf eine Membran übertragen (siehe 3.3.6) und analysiert (siehe 3.3.7).

3.3.5 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine im Gel nachzuweisen, wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue verwendet, der im sauren Milieu mit den Aminogruppen der Proteine reagiert und bindet (Neuhoff *et al.*, 1988). Das SDS-Polyacrylamidgel wurde dafür für 10 min bei RT in einer Fixierlösung und anschließend 30 min bei RT in einer Färbelösung geschwenkt. Zur Entfernung des überschüssigen und ungebundenen Farbstoffs wurde das SDS-Polyacrylamidgel anschließend in einer Entfärbelösung bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Entfärbelösung wurde alle 10-15 min gewechselt, bis die Proteinbanden im Gel sichtbar wurden und deutlich hervortraten.

3.3.6 Western Blot

Beim Western Blot werden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran transferiert (Towbin *et al.*, 1979; Burnette *et al.*, 1981). Im Anschluss werden durch Verwendung eines Primärantikörpers spezifische Proteine auf der Membran gebunden. Die Detektion dieser Bindung erfolgt durch Interaktion mit einem Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet und mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 3.3.4) wurden diese über einen *Semi-Dry* Blot auf eine Whatman Nitrozellulose-Membran (Protran[®] Pure Nitrozellulose Membran 0,2 µm, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) übertragen.

Dazu wurden die Nitrozellulosemembran sowie zwei Whatman 3MM-Filterpapiere (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) 10 min im Western Blot Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Western Blot in folgender Reihenfolge luftblasenfrei vom Plus- zum Minuspol auf die *Semi-Dry* Blot-Apparatur aufgebaut: Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte bei 1,5 mA/cm² und je nach Größe der nachzuweisenden Proteine für 1,5-3 h. Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Membran durch den Azofarbstoff Ponceau S, der an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine reversibel bindet, angefärbt. Damit wurde zum einen der gleichmäßige Transfer der Proteine auf die Membran kontrolliert und zum anderen konnte der Proteinmarker auf der Membran gekennzeichnet werden. Dazu wurde die Membran in einer Ponceau S-Färbelösung (0,1% (w/v) Ponceau S und 5% (w/v) Essigsäure) schwenkend inkubiert (5 min, RT) und durch mehrmaliges Waschen (5 min, RT) mit TBST wieder entfernt. Die immobilisierten Proteine wurden im Anschluss durch eine Immundetektion nachgewiesen (siehe 3.3.7).

3.3.7 Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese für mindestens 1 h in 5% (w/v) Milchpulver in 1× TBST bei RT und mäßigem Schütteln inkubiert, um so spätere unspezifische Antikörperbindungen auf der Membran zu minimieren. Anschließend wurde die Membran mit einer geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers, der in 2% (w/v) Milchpulver in 1× TBST angesetzt wurde, über Nacht geschwenkt (12-16 h, 4°C). Es folgten drei Waschschrte mit 1× TBST (10 min, RT) bevor die Membran mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper in 2% (w/v) Milchpulver in 1× TBST inkubiert und geschwenkt wurde (1-4 h, RT). Die Art des verwendeten Sekundärantikörpers richtete sich nach dem verwendeten Primärantikörper. Nach zweimaliger Inkubation der Membran in 1× TBST (10 min, RT) wurde sie, um bei der anschließenden Detektion eine optimale Aktivität der Meerrettich-Peroxidase zu erhalten, zweimal mit 1× TBS gewaschen (5 min, RT). Für die Detektion wurde eine selbsthergestellte Luminol-Substratlösung verwendet. Dafür wurden die frisch angesetzten Lösungen (Lösung A: 0,1 M Tris (pH 8,5); 0,4 mM β -Cumarsäure; 2,5 mM Luminol; Lösung B: 0,1 M Tris (pH 8,5); 0,03% (v/v) H_2O_2) zu gleichen Teilen miteinander gemischt. Die Membran wurde mit der Luminol-Substratlösung für 1-2 min unter Schwenken inkubiert. Je nach der zu erwarteten Stärke des Signals wurde alternativ als Detektionslösung entweder das SuperSignal® West Pico oder das SuperSignal® West Femto Kit (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers genutzt. Nach der jeweiligen Inkubation der Membran mit der Substratlösung wurde diese kurz abgetropft und in einer Klarsichtfolie in eine Fotokassette gelegt. Die Chemolumineszenz der Substratreaktion wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms durch verschiedene Expositionszeiten und dessen Entwicklung in der Röntgenfilmentwicklermaschine X-OMAT 2000 (Kodak, Rochester, New York, USA) nachgewiesen.

3.3.8 Ko-Immunpräzipitation

Eine Immunpräzipitation (IP) oder Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) dient dem Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen oder der Isolierung eines bestimmten Proteins aus einem Proteingemisch. Dabei wird das an einen Antikörper gebundene Protein zusammen mit seinen Interaktionspartnern aus einem Proteingemisch isoliert. Zum einen werden für eine Ko-IP Protein A und/oder Protein G eingesetzt, die mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Immunglobuline (Antikörper) aus Säugern binden. Mit Protein A und/oder Protein G werden Kügelchen, bestehend aus Agarose oder Sepharose, beschichtet

(sogenannte *Beads*), um in einer Ko-IP die Antikörper-Protein-Komplexe an sich zu binden. Zum anderen werden IgG-beschichtete Kügelchen verwendet, die spezifisch Protein A, einem Bestandteil des Tandem-Affinitätsanhangs (*Tandem Affinity Purification-Tag*, TAP-Anhang), binden können.

Für eine Ko-IP wurden Hefezellen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ($1-3 \times 10^7$ Zellen/mL). Nachdem 100-200 OD_{600 nm} der Hefezellen sedimentiert wurden ($2.500 \times g$, 5 min, 4°C), erfolgte ein Waschschriff mit 1 mL ddH₂O. Die Zellen wurden in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit einem Schraubverschluss überführt und erneut zentrifugiert ($16.100 \times g$, 1 min, 4°C). Das Zellpellet wurde direkt für die Ko-IP verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Pro 100 µL Zellpellet wurden 10 µL Proteaseinhibitor (*Protease Inhibitor Cocktail for use with fungal and yeast extracts* (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)) und 10 µL Proteaseinhibitor (*Complete EDTA-free* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)), 200 µL Glasperlen sowie 400 µL eiskalter PBSMKT-Puffer hinzugefügt. Nach kurzem, intensivem Vortexen wurden die Hefezellen mechanisch lysiert (FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) 4,5 m/s, 20 s). Zelltrümmer und Glasperlen wurden durch Zentrifugation sedimentiert ($16.100 \times g$, 2 min, 4°C), der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert ($16.100 \times g$, 5 min, 4°C), um ein reines Lysat zu erhalten. Von dem Überstand wurden 30 µL als Lysatkontrolle entnommen, mit 30 µL 2× SDS-Probenauftragspuffer versetzt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Der restliche Überstand wurde auf zwei Ansätze aufgeteilt, mit 10-20 µL *Beads* (Protein G Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, München, Deutschland) oder IgG Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, München, Deutschland), die zuvor durch fünfmaliges Waschen mit je 1 mL eiskaltem PBSMKT-Puffer äquilibriert ($600 \times g$, 5 min, 4°C) wurden, sowie bei Verwendung eines spezifischen Antikörpers mit 0,2-2 µg dessen versetzt. Die Proben wurden für 2-6 h bei 4°C rotierend inkubiert. Um indirekte Protein-Protein-Interaktionen, die beispielsweise über eine gemeinsame Bindung der Proteine an verschiedenen Positionen der mRNA zustande kommen können, auszuschließen, wurden einem der beiden Ansätze 200 µg/mL RNase A (Qiagen, Hilden, Deutschland) 30 min vor Ablauf der Inkubationszeit hinzugefügt. Die *Beads* mit den daran gebundenen Proteinkomplexen wurden nach der Ko-IP fünfmal mit 1 mL eiskaltem PBSMKT-Puffer gewaschen ($600 \times g$, 2 min, 4°C). Von dem nachfolgenden Waschschriff mit 0,2 mL PBSMKT-Puffer wurden nach der Zentrifugation ($600 \times g$, 2 min, 4°C) 30 µL entnommen und mit 30 µL 2× SDS-

Proben-aufragspuffer versetzt. Der restliche PBSMKT-Puffer wurde vorsichtig abgenommen, die verbleibenden *Beads* in 30 μ L 2 \times SDS-Probenaufragspuffer resuspendiert und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert, so dass auch die Bindung zwischen *Beads* und Proteinen aufgehoben wurde. Nach einer kurzen Zentrifugation (16.100 \times g, 1 min, 4°C) wurden die sich im Überstand befindenden Proteine über eine SDS-PAGE (siehe 3.3.4) mit anschließendem Western Blot (siehe 3.3.6) analysiert.

3.3.9 Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen

Zur Aufreinigung von rekombinant exprimiertem Protein wurde eine 500 mL Kultur (OD_{600nm} 0,5-0,8) eines *E. coli* Expressionsstammes *BL21 (DE3)* verwendet, der ein spezifisches Expressionsplasmid enthielt (pET-15b HIS-NPL3; pRSET-C HIS-GFP-NPL3; pRSET-C HIS-myc-NPL3). Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Inkubation mit IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM für 4 h bei 30°C. Die anschließende Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde unter nativen Bedingungen auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt und die verwendeten Puffer enthielten 1 \times Proteaseinhibitor (*Complete EDTA-free* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)). Nachdem die Zellen sedimentiert wurden (2.500 \times g, 15 min, 4°C), erfolgte ein Waschschriff mit 5 mL Lysepuffer. Die Zellen wurden in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (16.100 \times g, 1 min, RT). Für die Aufreinigung wurde das Zellpellet direkt verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nachdem das Zellpellet in 3-5 mL Waschpuffer I resuspendiert und die Zellen durch Sonifizierung aufgeschlossen wurden, erfolgten drei Zentrifugationsschritte (16.100 \times g, 5 min, 4°C), um die Zelltrümmer von dem Überstand zu separieren. Der Überstand wurde nach jeder Zentrifugation in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Inkubation des reinen Lysates mit 100-200 μ L Ni-NTA Agarose-*Beads* (Qiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte rotierend für 2-4 h bei 4°C. Die *Beads* mit dem daran gebundenen rekombinant exprimierten Protein wurden nacheinander zweimal mit 1 mL eiskaltem Lysepuffer, zweimal mit Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II gewaschen. Die Sedimentation der *Beads* zwischen den Waschschriffen erfolgte durch Zentrifugation (600 \times g, 2 min, 4°C). Letztendlich wurde das rekombinante Protein durch Zugabe von 500 μ L Elutionspuffer mit anschließender Inkubation von 15 min bei 4°C eluiert. Die Reinheit des im Überstand befindenden rekombinanten Proteins wurde durch eine Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgeles analysiert (siehe 3.3.4 und 3.3.5) und

zusätzlich mittels Western Blot analysiert (siehe 3.3.6 und 3.3.7). Die notwendige Umpufferung des Eluates und Aufkonzentrierung des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe von Sephadex G25-Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland).

3.3.10 *In vitro* Ko-Immunpräzipitation

Für die *in vitro* Ko-IP wurden zunächst die *Beads* (Protein G Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, München, Deutschland) durch fünfmaliges Waschen mit je 1 mL eiskaltem PBSMKT-Puffer äquilibriert ($600 \times g$, 5 min, 4°C) und über Nacht mit 10 mg/mL BSA rotierend bei 4°C blockiert. Die rekombinanten Proteine HIS-Npl3 und HIS-myc-Npl3 bzw. HIS-Npl3 und HIS-GFP-Npl3 in eiskaltem PBSMKT-Puffer wurden mit $1 \times$ Proteaseinhibitor (*Complete EDTA-free* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)), 10 µL blockierten *Beads* sowie mit 0,2-2 µg des spezifischen Antikörpers versetzt und rotierend für 2-4 h bei 4°C. Die *Beads* wurden nach der Ko-IP fünfmal mit 1 mL eiskaltem PBSMKT-Puffer gewaschen ($600 \times g$, 2 min, 4°C). Nach dem finalen Waschschrift mit 0,2 mL PBSMKT-Puffer wurden 30 µL entnommen und mit 30 µL $2 \times$ SDS-Probenauftragspuffer versetzt. Die *Beads* wurden nach vorsichtiger Entfernung des restlichen PBSMKT-Puffers in 30 µL $2 \times$ SDS-Probenauftragspuffer resuspendiert und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden für 5 min bei 95°C denaturiert, so dass auch die Bindung zwischen *Beads* und Proteinen aufgehoben wurde. Nach einer Zentrifugation ($16.100 \times g$, 1 min, 4°C) wurden die sich im Überstand befindenden Proteine über eine SDS-PAGE (siehe 3.3.4) mit anschließendem Western Blot (siehe 3.3.6 und 3.3.7) analysiert.

3.3.11 *In vitro* RNA Ko-Immunpräzipitation

Vor der *in vitro* RNA Ko-IP wurden zunächst die rekombinanten Proteine in RNA-Bindepuffer äquilibriert. Anschließend wurde das rekombinante HIS-myc-Npl3 bzw. HIS-GFP-Npl3 in RNA-Bindepuffer mit jeweils 1 µg des Fragmentes der *in vitro* transkribierten 25S rRNA (siehe 3.1.13) bzw. über PCR-amplifizierter 25S rDNA (siehe 3.1.10), $1 \times$ Proteaseinhibitor (*Complete EDTA-free* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)), 10 U/mL RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 10 µL *Beads* (Protein G Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, München, Deutschland) sowie mit 0,2-2 µg des spezifischen Antikörpers versetzt. Nach der rotierenden Inkubation der Proben für 1-2 h bei 4°C wurden die *Beads* fünfmal mit 1 mL eiskaltem PBSMKT-Puffer gewaschen ($600 \times g$, 2 min, 4°C) und in 100 µL

ddH₂O_{DEPC} resuspendiert, bevor die RNA durch eine Inkubation von 10 min bei 65°C eluiert wurde. Nach Aufreinigung der RNA über Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 3.1.2) wurde diese in 20 µL ddH₂O_{DEPC} mit 5 U RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) gelöst und bis zur späteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentration der gereinigten RNA wurde spektralphotometrisch gegen ddH₂O_{DEPC} als Referenz ermittelt (siehe 3.1.3). Die Bindung der 25S rRNA-Fragmente wurde durch semiquantitative RT-PCR mit spezifischen Primern analysiert (siehe 3.1.11).

3.4 Immuncyto- und immunhistochemische Methoden

Alle mikroskopischen Studien wurden an einem Leica AF6000 Fluoreszenz-Mikroskop durchgeführt. Die Aufnahme und Auswertung von Bildern erfolgte mit Hilfe der ORCA ERA Kamera von Hamamatsu (Herrsching am Ammersee, Deutschland) sowie der LAS AF 1.6.2 Software von Leica (Wetzlar, Deutschland).

3.4.1 GFP-Mikroskopie

Für Lokalisierungsstudien eines mit GFP-fusionierten Proteins wurden logarithmisch wachsende Hefezellen ($1-3 \times 10^7$ Zellen/mL) durch Zugabe von 37% (v/v) Formaldehyd mit einer Endkonzentration von 2,5% (v/v) fixiert. Nach einer kurzen Inkubation (10-30 s, RT) wurden die Hefezellen durch Zentrifugation pelletiert ($2.000 \times g$, 5 min, RT). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 mL P-Lösung gewaschen und entsprechend der Zellmenge in 100-500 µL P-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension konnte bis zu 5 Tage bei 4°C gelagert oder direkt verwendet werden. Um das Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurden alle folgenden Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Dazu wurden 25 µL der Zellen auf einen Objektträger mit 12 kreisförmigen Aussparungen bzw. Kammern (Kobe, Marburg, Deutschland) aufgebracht. Damit die Hefezellen auf dem Objektträger besser haften, wurde dieser zuvor mit Poly-L-Lysin behandelt (0,3% (w/v) Poly-L-Lysin, 5-15 min, RT), mit ddH₂O kurz gespült und anschließend luftgetrocknet. Durch das Poly-L-Lysin bildet sich eine polykationische Matrix auf der Objektträgeroberfläche, die eine erhöhte Adhäsion auf die negativ geladenen Zelloberflächen der Hefezellen ausübt. Nach 5-15 min wurden die überschüssigen Hefezellen mit einer Pasteurpipette an einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen auf dem Objektträger für 5 min mit einer 0,5% (v/v) Triton X-100-haltigen P-Lösung permeabilisiert. Anschließend wurden die Hefezellen einmal mit der P-Lösung und einmal mit Aby-Waschlösung 2 gewaschen. Danach wurde die DNA mit 0,03 µM, des

in Aby-Waschlösung 2 verdünnten Farbstoffes DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), der sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA anlagert, angefärbt (2-5 min, RT). Die Inkubation der Hefezellen mit DAPI sowie alle weiteren Schritte erfolgten unter Lichtausschluss, um das Ausbleichen von DAPI zu reduzieren. Nach Entfernung des Farbstoffs wurden die Zellen dreimal für 5 min mit Aby-Waschlösung 2 inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger nach dem Absaugen der Aby-Waschlösung 2 Lösung im Dunkeln luftgetrocknet (15-30 min) und zur Verlängerung der Haltbarkeit der Fluoreszenz wurden die Hefezellen mit Mounting-Medium bedeckt, der Objektträger mit einem Deckglas versehen und mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20°C.

3.4.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von mRNA

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren, um Nukleinsäuren, wie RNA oder DNA, in Geweben oder in einzelnen Zellen, mit Hilfe einer künstlich hergestellten Sonde, die über Basenpaarung an die spezifische Nukleinsäure bindet, nachzuweisen. Für die FISH von mRNA wurden Hefezellen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ($1-3 \times 10^7$ Zellen/mL). Durch Zugabe von 37% (v/v) Formaldehyd auf eine Endkonzentration von 2,6% (v/v) wurden die Hefezellen fixiert. Nach einer Inkubation von 30-60 min auf einem Kulturröhrchenrotator oder in einem Wasserbad wurden die Hefezellen durch Zentrifugation pelletiert ($2.000 \times g$, 5 min, RT). Anschließend wurden die Hefezellen zweimal mit 1 mL P-Lösung gewaschen und entsprechend der Zellmenge in 100-500 µL P-Lösung aufgenommen. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden 100 µL der Zellsuspension mit 10 mM DTT inkubiert (10 min, RT) und anschließend die Zellwand durch Zugabe von 1-10 U Zymolase enzymatisch aufgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde im Phasenkontrastmikroskop verfolgt, bis ein gewisser Anteil der Hefezellen (50-75%) Sphäroplasten ausbildete und unter dem Mikroskop dunkel erschien. Die Zymolase wurde durch Zentrifugation entfernt ($16.100 \times g$, 10 s, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 100 µL P-Lösung resuspendiert.

Anschließend wurden 25 µL der Zellsuspension auf einen Objektträger mit 12 kreisförmigen Aussparungen bzw. Kammern (Kobe, Marburg, Deutschland) gegeben (5-15 min, RT), die Zellen mit P-Lösung und 0,5% (v/v) Triton X-100 permeabilisiert (10 min, RT) und einmal kurz mit P-Lösung gewaschen. Nachdem die Zellen mit 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) äquilibriert wurden (2 min, RT) folgte eine Inkubation mit

0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) (10 min, RT), wodurch die polaren Gruppen der Proteine blockiert werden. Nach der Prähybridisierung der Proben mit Hybridisierungspuffer für 1-2 h bei 37°C wurde die Sonde mit einer Verdünnung von 1:500 zugesetzt. Als Sonde wurde ein, am 3'-Ende mit dem Fluorochrom Cy3 gekoppeltes, Oligonukleotid, das sich aus 50 Desoxythymidinen zusammensetzte (oligo-dT₅₀) und spezifisch die poly(A⁺)-mRNA detektiert, verwendet. Die Hybridisierung der Proben erfolgte über Nacht (12-16 h) bei 37°C. Anschließend wurden die Hefezellen kurz und danach für 60 min bei RT mit 2× SSC-Lösung inkubiert. Nach einem Waschschrift in 1× SSC-Lösung (60 min, RT) folgte einer für 30 min bei 37°C und einer für 30 min bei RT mit einer 0,5× SSC-Lösung. Danach wurden die Hefezellen mit Aby-Waschlösung 1 (1 min, RT) und mit Aby-Waschlösung 2 (5 min, RT) gewaschen. Im Anschluss wurde die DNA mit DAPI markiert (2-5 min, RT). Zur Entfernung des überschüssigen DAPI-Farbstoffes folgten drei weitere Waschschriffe mit Aby-Waschlösung 2 für jeweils 5 min bei RT. Danach wurde der Objektträger im Dunkeln getrocknet und Mounting-Medium auf die Hefezellen gegeben. Anschließend wurde der Objektträger mit einem Deckglas versehen und mit klarem Nagellack luftdicht versiegelt.

3.4.3 Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz dient der Analyse der Lokalisation von Proteinen in einer Zelle mittels Antikörperdetektion. Die Herstellung und Fixierung der Proben sowie die enzymatische Lyse der Zellwand vor dem Aufbringen der Zellen auf einen Objektträger erfolgten wie bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (siehe 3.4.2). Im Anschluss an die Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,5% (v/v) Triton X-100 in P-Lösung (5 min, RT) wurden die Zellen für 1-2 h bei RT mit Antikörper-Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Der Erstantikörper wurde in Antikörper-Blockierungspuffer verdünnt, auf die Zellen gegeben und über Nacht (12-16 h) bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert (Kaninchen-anti-Nop1 1:200, Maus-anti-GFP 1:200). Überschüssige Antikörpermoleküle wurden durch einen kurzen Waschschrift mit Aby-Waschlösung 1 (1 min, RT) sowie aufeinanderfolgende Waschschriffe für 10 min und 30 min mit Aby-Waschlösung 1 bei RT, sowie für 10 min und 30 min mit Aby-Waschlösung 2 bei RT entfernt. Zur Detektion des Erstantikörpers wurde der Fluoreszenz-markierte Zweitantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG AlexaFluor[®] 594 1:200, Ziege-anti-Maus-IgG AlexaFluor[®] 488 1:200 (Invitrogen, Frankfurt, Deutschland)) in einer entsprechenden Verdünnung in Blockierungspuffer für 1-2 h bei RT auf die Zellen

gegeben. Die Entfernung ungebundener Antikörpermoleküle erfolgte mit Hilfe der zuvor beschriebenen Waschschrirte. Die DNA der Zellen wurde anschließend mit DAPI gefärbt (siehe 3.4.2), Mounting-Medium auf die Hefezellen gegeben und letztendlich mit einem Deckgläschen versehen und mit klarem Nagellack luftdicht versiegelt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Deletion von *NPL3* führt zu Translationsdefekten

Das pendelnde, mRNA-bindende SR-Protein Npl3p wird im Zellkern an die transkribierende mRNA rekrutiert und besitzt wichtige Funktionen während des mRNA-Exports (Lee *et al.*, 1996; Krebber *et al.*, 1999). Nachdem das mRNP in das Zytoplasma transportiert worden ist, dissoziiert Npl3p im Gegensatz zu dem Exportrezeptorheterodimer Mex67p-Mtr2p nicht von der mRNA (Lund und Guthrie, 2005). Stattdessen verbleibt Npl3p während des Translationsprozesses weiterhin mit der mRNA assoziiert (Windgassen *et al.*, 2004). Die koordinierte Dissoziation von Npl3p ist für eine effiziente Translation notwendig, da eine Mutante von *NPL3*, *npl3-27*, auf Grund von Defekten in der Dissoziation von der mRNA inhibitorisch auf die Translation wirkt (Windgassen *et al.*, 2004). Allerdings sind diese zytoplasmatischen Funktionen von Npl3p, die vor oder während der Translation erfolgen, noch weitestgehend ungeklärt.

Zur Charakterisierung der möglichen Aufgaben von Npl3p während des Translationsprozesses wurde ein spezieller Stammhintergrund, in dem *NPL3* nicht essentiell ist, verwendet. Dieser so genannte *BY*-Stammhintergrund wurde in einem weltweiten Hefeprojekt genutzt, bei dem etwa 6.000 ORF's, unter anderem auch *NPL3*, deletiert wurden (Brachmann *et al.*, 1998; Winzeler *et al.*, 1999). Wachstumsanalysen des Hefestammes mit einer *NPL3*-Deletion (*npl3Δ*) zeigen, dass dieser sowohl bei 25°C als auch bei 37°C Wachstumsdefekte aufweist (Abb. 12). Im Gegensatz dazu ist das Wachstum von *npl3Δ* bei 30°C und 35°C ähnlich dem von Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Als Nachweis, dass dieser Wachstumsunterschied bei 25°C und 37°C durch die Deletion von *NPL3* hervorgerufen wird, wurde das Wachstum von *npl3Δ* in Anwesenheit eines *NPL3*-exprimierenden Plasmides untersucht.

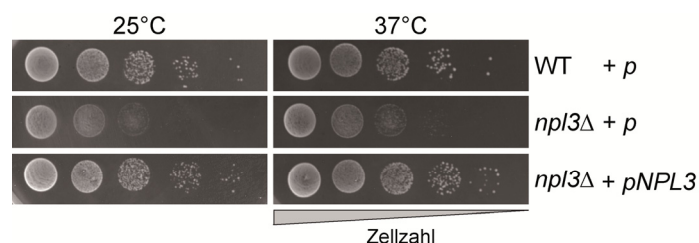


Abbildung 12: Die Deletion von *NPL3* im *S. cerevisiae* *BY*-Stammhintergrund führt zu Wachstumsdefekten.

Das Wachstum von *S. cerevisiae* Wildtyp (WT) mit einem Leervektor (*p*) sowie dem isogenen Hefestamm mit einer Deletion von *NPL3* (*npl3Δ*), mit einem Leervektor (*p*) oder einem *NPL3*-exprimierenden Plasmid (*pNPL3*), wurde in serieller Verdünnung auf Selektionsagarplatten getropft und nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 25°C bzw. 37°C analysiert.

Die Wachstumsanalyse zeigt, dass durch die Expression von *NPL3* in *npl3Δ* ein zu Wildtyp identisches Wachstum wiederhergestellt wird (Abb. 12). Daher wird der Wachstumsdefekt durch die *NPL3*-Deletion hervorgerufen.

Zur Aufklärung der Ursache für den beobachteten Wachstumsdefekt wurde zunächst der Export der mRNA analysiert, da Npl3p die mRNA in das Zytoplasma transportiert und beim mRNA-Export wichtige Funktionen aufweist. Diesbezüglich könnte ein verringerter oder blockierter Transport der mRNA in das Zytoplasma zu einem reduzierten Wachstum in *npl3Δ* führen. Des Weiteren weisen temperatursensitive Mutanten von *NPL3* im *S288C*-Stammhintergrund, in dem *NPL3* essentiell ist, einen unterschiedlich starken mRNA-Exportdefekt auf (Lee *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Beobachtungen und der Annahme, dass *npl3Δ* mRNA-Exportdefekte aufweist, wurde eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit einer Cy3-gekoppelten oligo-dT₍₅₀₎ Sonde, die spezifisch den poly(A)-Schwanz von polyadenylierten mRNA's detektiert, durchgeführt.

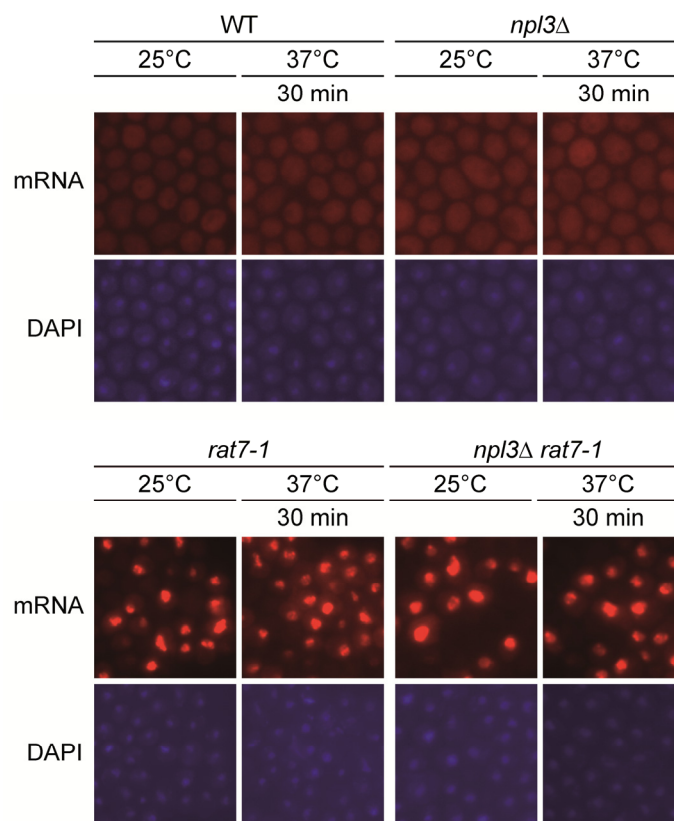


Abbildung 13: Die Deletion von *NPL3* im *S. cerevisiae* BY-Stammhintergrund führt zu keinen mRNA-Exportdefekten.

Die Lokalisation der mRNA wurde in Wildtyp (WT), der mRNA-Export-defizienten Nukleoporinmutante *rat7-1*, *npl3Δ* und der Doppelmutante *npl3Δ rat7-1* analysiert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, anschließend geteilt und bei 25°C bzw. für 30 min bei 37°C inkubiert. Die polyadenylierten mRNA's wurden mittels einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durch eine Cy3-gekoppelte oligo-dT₍₅₀₎ Sonde detektiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

Die Lokalisation der mRNA in *npl3Δ* zeigt, dass bei 25°C und nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C die mRNA, ähnlich zu Wildtyp, im Zellkern und im Zytoplasma gleichmäßig verteilt ist (Abb. 12). Als Positivkontrolle für einen auftretenden mRNA-Exportdefekt wurde eine temperatursensitive Mutante des Nukleoporins Rat7p/Nup159p (*rat7-1*) verwendet, das spezifisch den Transport der mRNA in das Zytoplasma vermittelt (Gorsch *et al.*, 1995). Die Mutante *rat7-1* weist bei 25°C mRNA-Exportdefekte auf, die sich bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C weiter verstärken, so dass die mRNA im Zellkern akkumuliert (Abb. 13).

Da Npl3p während einer frühen Phase der Transkription an die mRNA rekrutiert wird, ist nicht auszuschließen, dass durch die Deletion von *NPL3* die Expression auf der Ebene der Transkription verringert und damit letztendlich die Wachstumsrate reduziert wird (Lei *et al.*, 2001). Dies würde Transkriptions- und/oder Prozessierungsdefekte des poly(A)-Schwanzes der mRNA oder ein quantitatives Detektionsproblem in der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung hervorrufen, da eine zu geringe Menge der mRNA, durch die Cy3-gekoppelte oligo-dT₍₅₀₎ Sonde nicht oder nur eingeschränkt detektiert werden kann. Aus diesem Grund wurde ein Hefestamm hergestellt, der sowohl die temperatursensitive Mutation *rat7-1*, als auch die Deletion von *NPL3* besitzt. Die Analyse des mRNA-Exports der *npl3Δ rat7-1* Doppelmutante zeigt, vergleichbar zu *rat7-1*, sowohl eine Reduktion der zytoplasmatischen Lokalisation der mRNA, als auch eine durch den Exportdefekt hervorgerufene Akkumulation der mRNA im Zellkern (Abb. 13). Daher sind Transkriptionsdefekte als Ursache für das verringerte Wachstum unwahrscheinlich. Zusätzlich wurde die Quantität der mRNA in *npl3Δ* mit Hilfe von Northern-Blot-Analysen untersucht und kein Unterschied zu Wildtyp nachgewiesen (Daten von Alexandra Hackmann, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung).

Da weder eine verringerte Transkription noch ein eingeschränkter mRNA-Export den Wachstumsdefekt in *npl3Δ* hervorrufen, wurde im nächsten Schritt die Translationsrate und -effizienz analysiert. Dafür wurden sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Hefezellen mit radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Methionin inkubiert, das während des Translationsprozesses in die synthetisierten Proteine eingebaut wird und mit Hilfe von Autoradiographie detektiert werden kann. Im Vergleich zum Wildtyp weist *npl3Δ* bei 25°C eine reduzierte Translationsrate auf, die sich nach einer Inkubation bei 37°C weiter verringert, so dass eine Deletion von *NPL3* einen negativen Effekt auf die Proteinbiosynthese ausübt (Abb. 14A). Verglichen mit Wildtyp, zeigt *npl3Δ* bei 25°C eine um 24% ± 4% geringere Translationsrate. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37°C sinkt

die Translationsrate auf $60\% \pm 4\%$ bzw. nach 30 min auf $41\% \pm 6\%$ (Abb. 14B). Im Vergleich zum Wildtyp erhöht sich die Translationsrate in *npl3Δ* nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C wieder auf durchschnittlich $68\% \pm 9\%$. Im Gegensatz zu der abgestuften Translationsrate in *npl3Δ* wird die Neusynthese der Proteine in der Translationsmutante *prt1-1*, einer Untereinheit des eIF3-Komplexes, bei 37°C vollständig blockiert (Phan *et al.*, 1998) (Abb. 14B).

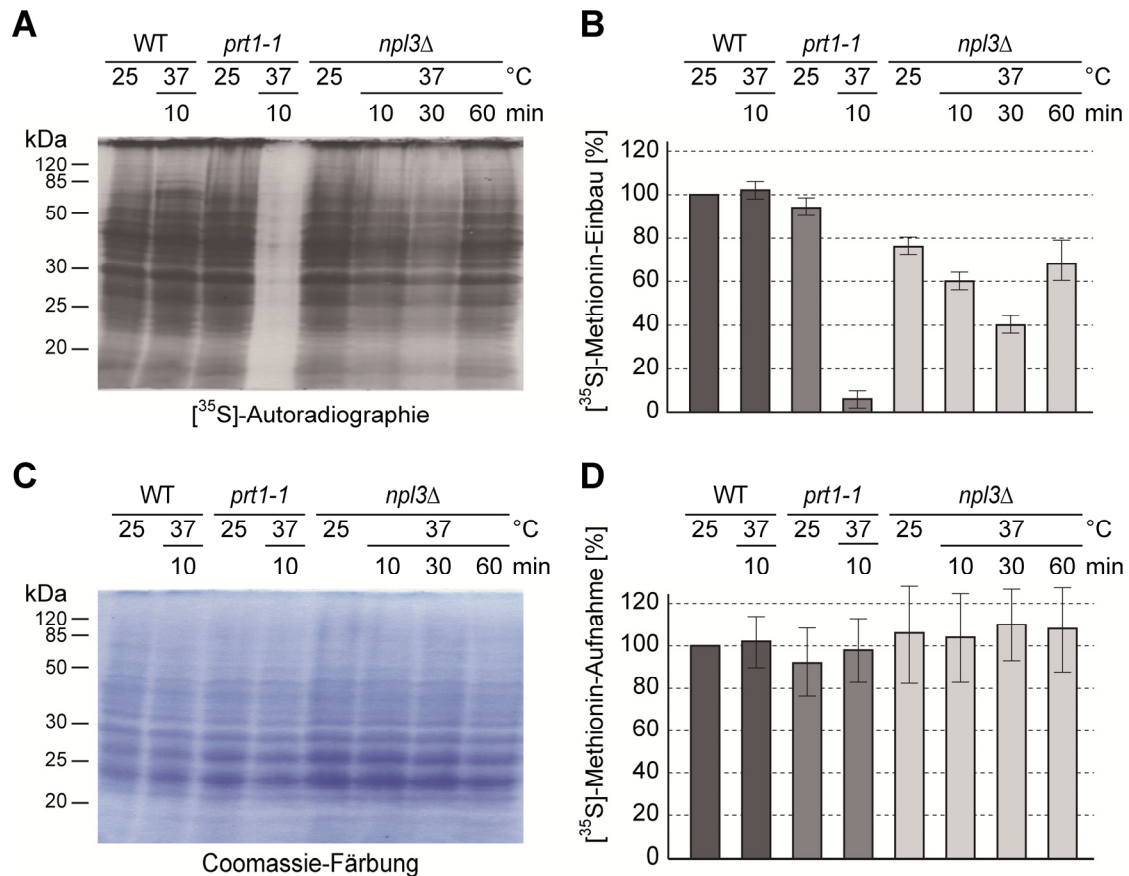


Abbildung 14: Die Deletion von *NPL3* im *S. cerevisiae* BY-Stammhintergrund führt zu Translationsdefekten.

Für die Analyse der *de novo* Proteinbiosynthese wurden Wildtyp (WT), *npl3Δ* sowie die Translationsinitiations-mutante *prt1-1* bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Methionin-freiem Medium bei 25°C angezogen, anschließend geteilt und entweder bei 25°C oder für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Methionin wurde dessen Einbau in die synthetisierten Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE autoradiographisch analysiert (A). Die Autoradiographien von 10 unabhängigen Experimenten wurden quantifiziert (B). Zusätzlich wurde zum einen die gleichmäßige Ladung des SDS-Polyacrylamidgels durch eine Coomassie-Färbung kontrolliert (C). Zum anderen wurde die gleichmäßige Aufnahme des radioaktiv-markierten [³⁵S]-Methionins in die Hefezellen mittels Szintillationsmessung der Zellpellets und anschließender Quantifizierung von 10 unabhängigen Experimenten überprüft (D).

Als Ladungskontrolle wurden die Proteine vor der Autoradiographie durch den Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue im SDS-Polyacrylamidgel gefärbt. Die Gesamtmenge der analysierten Proteine zeigt im Gegensatz zu den [³⁵S]-Methionin-markierten Proteinen keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp, *npl3Δ* und *prt1-1* (Abb. 14C). Um

auszuschließen, dass die zelluläre Aufnahme des radioaktiv markierten [³⁵S]-Methionin in *npl3Δ* verringert wird, wodurch dessen Einbaurate in die Proteine beeinflusst werden kann, wurde die Menge des radioaktiv markierten [³⁵S]-Methionin in den Zellpellets mittels Szintillationsmessung bestimmt. Die Aufnahmerate des radioaktiv markierten [³⁵S]-Methionins in die Zellen der verschiedenen Hefestämme zeigt keine signifikanten Unterschiede, welche zur reduzierten Menge der detektierten [³⁵S]-Methionin-markierten Proteine in *npl3Δ* führen könnten (Abb. 14D).

4.2 Npl3p ist ein generelles Protein für den mRNA-Export

Da Npl3p im *BY*-Stammhintergrund nicht essentiell ist und für den Transport der mRNA in das Zytoplasma nicht benötigt wird, stellte sich die Frage, ob Npl3p mRNP's in das Zytoplasma transportiert. Daher wurden Lokalisationsstudien von Npl3p in *npl3Δ rat7-1* des *BY*-Stammhintergrundes, in denen spezifisch der Export der mRNA blockiert werden kann, im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Sofern Npl3p als Bestandteil des mRNP's an dessen Export beteiligt ist, würde das Protein in *rat7-1* zusammen mit der mRNA im Zellkern akkumulieren. Da allerdings die Importrate von Npl3p dessen Exportrate in das Zytoplasma übersteigt, lokalisiert das Protein vorwiegend im Zellkern. Daher ist es nicht möglich, eine durch einen mRNA-Exportdefekt hervorgerufene, nukleäre Anreicherung des Proteins nachzuweisen.

Aufgrund dessen wurde eine zytoplasmatisch lokalisierte, GFP-gekoppelte Variante von Npl3p, *npl3_cp-GFP* (*npl3-RA8p-GFP*), verwendet (Gilbert *et al.*, 2001). Diese *NPL3*-Mutante weist im Carboxyterminus, der für die Interaktion mit dem Importrezeptor Mtr10p verantwortlich ist, an der Position 411 einen Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin auf. Dadurch wird zum einen die Phosphorylierung des Serinrestes inhibiert, zum anderen die Affinität von *npl3_cp-GFP* zu Mtr10p reduziert. Infolgedessen wird die Importrate auf das gleiche Niveau wie die Exportrate verringert und die Lokalisation des Proteins verändert sich dahingegen, dass eine Gleichverteilung im Zellkern und Zytoplasma erreicht wird (Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001).

Da *rat7-1* ausschließlich Defekte im mRNA-Export, jedoch nicht im Proteinimport oder -export aufweist, wurde die Lokalisation von *npl3_cp-GFP* in *npl3Δ rat7-1* im *BY*-Stammhintergrund untersucht. Nach einer kurzzeitigen Inkubation der Hefezellen für 10 bzw. 30 min bei 37°C akkumuliert *npl3_cp-GFP* im Zellkern (Abb. 15). Aufgrund der in *rat7-1* innerhalb weniger Minuten einsetzenden mRNA-Exportdefekte erfolgt gleichzeitig

eine Blockierung des Exports von npl3_cp-GFP, die die nukleäre Anreicherung des Reporterproteins hervorruft. Im Gegensatz dazu zeigt Wildtyp sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern eine unveränderte Lokalisation des Reporterproteins. Somit kann Npl3p ebenso in diesem Stammhintergrund, in dem es nicht essentiell für den mRNA-Export ist, als ein Bestandteil des mRNP's diesen in das Zytoplasma transportieren.

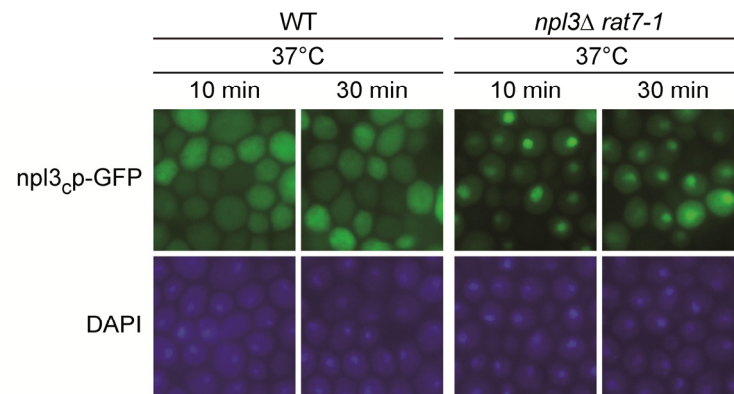


Abbildung 15: Npl3p ist ein Bestandteil des zu exportierenden mRNP's im *S. cerevisiae* BY-Stammhintergrund.

Die Lokalisation von npl3_cp-GFP in Wildtyp (WT) und der mRNA-Exportmutante *npl3Δ rat7-1*, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nach einer Inkubation von 10 bzw. 30 min bei 37°C analysiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

Da *NPL3* im *BY*-Stammhintergrund nicht essentiell ist, ist es wahrscheinlich, dass die Funktionen von Npl3p, beispielsweise die des mRNA-Exports, durch andere Proteine übernommen werden. In *S. cerevisiae* wurden mit Gbp2p und Hrb1p zwei nicht essentielle, zu Npl3p homologe Proteine (~25% Homologie in der Aminosäuresequenz) der SR-Proteinfamilie identifiziert, die beim Transport der mRNP's in das Zytoplasma ebenfalls an der mRNA gebunden sind (Windgassen und Krebber, 2003; Hacker und Krebber, 2004). Um zu testen, ob Gbp2p und/oder Hrb1p die Exportfunktion teilweise oder vollständig in *npl3Δ* übernehmen, wurden zunächst die genetischen Interaktionen dieser Proteine analysiert. Dazu wurden die Deletionsmutanten *npl3Δ gbp2Δ*, *npl3Δ hrb1Δ* und *npl3Δ gbp2Δ hrb1Δ* über Kreuzung der Einzel- bzw. Doppeldeletionsstämme mit anschließender Tetradendissektion in Anwesenheit eines *NPL3*-exprimierenden Plasmides mit einer *URA3*-Resistenz hergestellt. Die Deletionen der entsprechenden Gene in diesen Hefestämmen wurden durch PCR von gDNA verifiziert (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden Wachstumsanalysen der verschiedenen Hefestämme in serieller Verdünnung auf -URA-Agarplatten durchgeführt, so dass die genomische Deletion von *NPL3* durch das Plasmid aufgehoben wurde. Zusätzlich wurde das Wachstum der Hefestämme auf FOA-Agarplatten analysiert. Die durch das *URA3*-Gen kodierende Orotidin-5'-Phosphat (OMP)-Decarboxylase wandelt FOA in eine toxische Substanz um,

so dass auf diesen Selektionsagarplatten ausschließlich Hefezellen wachsen können, die kein *URA3*-Gen besitzen und somit das *NPL3*-exprimierende Plasmid verloren haben müssen.

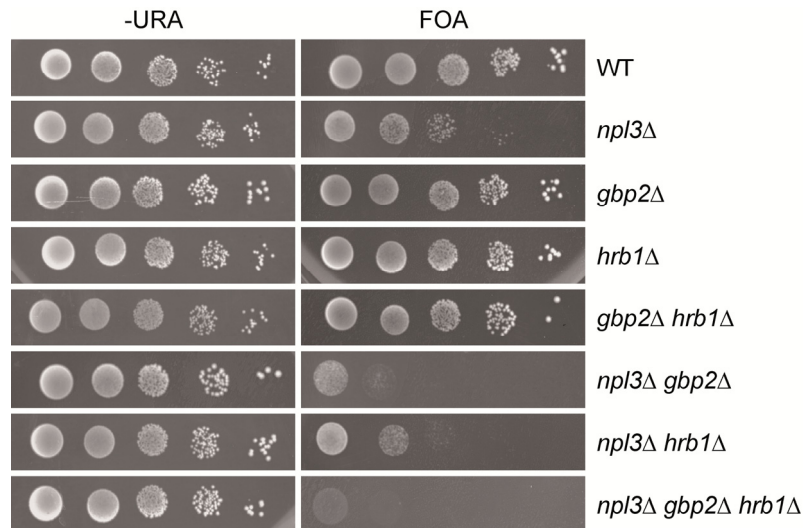


Abbildung 16: Die Doppeldeletion von *NPL3* in Kombination mit *GBP2* bzw. *HRB1* im *S. cerevisiae* *BY*-Stammhintergrund führt zu Wachstumsdefekten und die gleichzeitige Deletion der drei SR-Proteine *NPL3*, *GBP2* und *HRB1* zur synthetischen Letalität.

Das Wachstum von Hefezellen mit Einzel-, Doppel- oder der Tripledeltion von *NPL3*, *GBP2* und *HRB1* wurde im Vergleich zum Wildtyp (WT) entweder auf -URA Selektionsagarplatten in Anwesenheit eines *NPL3*-exprimierenden Plasmides oder auf FOA-Agarplatten, die auf den Verlust des *NPL3*-exprimierenden Plasmides selektionieren, nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 25°C analysiert.

Sowohl die Hefestämme mit den Einzeldeltionen *GBP2* bzw. *HRB1* als auch die kombinierte Deletion beider Gene zeigt im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung im Wachstumsverhalten (Abb. 16). Die beiden SR-Proteine Gbp2p und Hrb1p sind im *BY*-Stammhintergrund nicht essentiell (Brachmann *et al.*, 1998; Winzeler *et al.*, 1999). Allerdings führt eine Kombination von *npl3Δ* sowohl mit *gbp2Δ* als auch mit *hrb1Δ* im Vergleich zu *npl3Δ* zu einer verringerten Teilungs- und Überlebensrate, wobei *npl3Δ gbp2Δ* einen im Vergleich zu *npl3Δ hrb1Δ* stärkeren Wachstumsdefekt aufweist. Da *npl3Δ gbp2Δ hrb1Δ* kein Wachstum auf FOA-Agarplatten zeigt, führt die Deletion der drei SR-Proteine zur synthetischen Letalität, das sowohl auf eine genetische Interaktion als auch auf eine partielle funktionelle Redundanz der einzelnen SR-Proteine untereinander hindeutet.

Zur Untersuchung der Effekte der Einzel- und Doppeldeletionen der SR-Proteine auf den mRNA-Export wurde eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit Hilfe einer Cy3-gekoppelten oligo-dT₍₅₀₎ Sonde in den Hefestämmen durchgeführt. Die Analyse des mRNA-Exports zeigt, dass sowohl bei 25°C als auch nach einer Inkubation von 30 min bzw. 3 h bei 37°C die mRNA in den Einzel- (*npl3Δ*, *gbp2Δ*, *hrb1Δ*) oder Doppeldeletions-

stämmen (*gbp2Δ hrb1Δ*, *npl3Δ gbp2Δ*, *npl3Δ hrb1Δ*) im Vergleich zum Wildtyp gleichmäßig im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert ist, wohingegen die Positivkontrolle *rat7-1* eine Akkumulation der mRNA im Zellkern aufweist (Abb. 17 und Daten nicht gezeigt). Daher führt jegliche lebensfähige Kombination der Deletionen der drei SR-Proteine in *S. cerevisiae* sowohl bei 25°C als auch bei 37°C zu keinem mRNA-Exportdefekt.

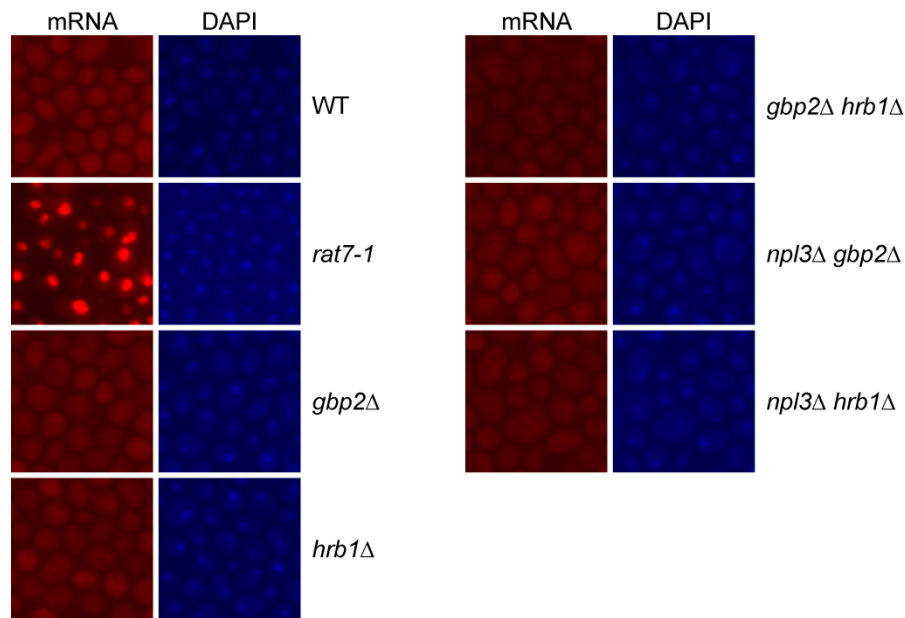


Abbildung 17: Die Einzel- bzw. Doppeldeletionen der SR-Proteine *NPL3*, *GBP2* und *HRB1* im *S. cerevisiae* BY-Stammhintergrund führen nicht zu mRNA-Exportdefekten.

Die Lokalisation der mRNA wurde in Wildtyp (WT), *rat7-1*, den Einzelmутanten *gbp2Δ* und *hrb1Δ* sowie den Doppelmутanten *gbp2Δ hrb1Δ*, *npl3Δ gbp2Δ* und *npl3Δ hrb1Δ* im *S. cerevisiae* BY-Stammhintergrund analysiert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen und die polyadenylierten mRNA's mittels einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durch eine Cy3-gekoppelte oligo-dT₍₅₀₎ Sonde detektiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

4.3 Npl3p transportiert die ribosomale prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma

Für die reduzierte Translationsrate in *npl3Δ*, die weder durch Transkriptions- noch durch mRNA-Exportdefekte hervorgerufen wird, muss daher eine andere Ursache vorliegen. Da Npl3p mit der mRNA bei dessen Transport in das Zytoplasma und bis zu einem frühen Zeitpunkt der Translation assoziiert ist, könnte Npl3p zum einen direkt den Translationsprozess beeinflussen. Zum anderen könnte die Deletion von *NPL3* die Reifung und/oder den Transport der prä-ribosomalen Untereinheiten inhibieren, wodurch die Anzahl dieser im Zytoplasma und somit die Translationsrate in *npl3Δ* verringert wird.

Zur Analyse des Exports beider prä-ribosomaler Untereinheiten in *npl3Δ* wurden zwei an GFP-gekoppelte Reporterproteine verwendet. Zum einen wurde der Export von

Rpl25p-GFP, einem Protein der ribosomalen 60S-Untereinheit, und zum anderen von Rps2p-GFP, einem Protein der ribosomalen 40S-Untereinheit, untersucht. Eine temperatur-sensitive Mutante des Exportins *XPO1*, *xpo1-1*, wurde zusätzlich als Kontrolle für den ribosomalen Export verwendet. Xpo1p assoziiert mit beiden prä-ribosomalen Untereinheiten und transportiert diese in das Zytoplasma. Die Mutante *xpo1-1* weist demzufolge nach einer Inkubation bei 37°C Exportdefekte der beiden prä-ribosomalen Untereinheiten auf (Moy und Silver, 1999; Gadgil *et al.*, 2001) (Abb. 18).

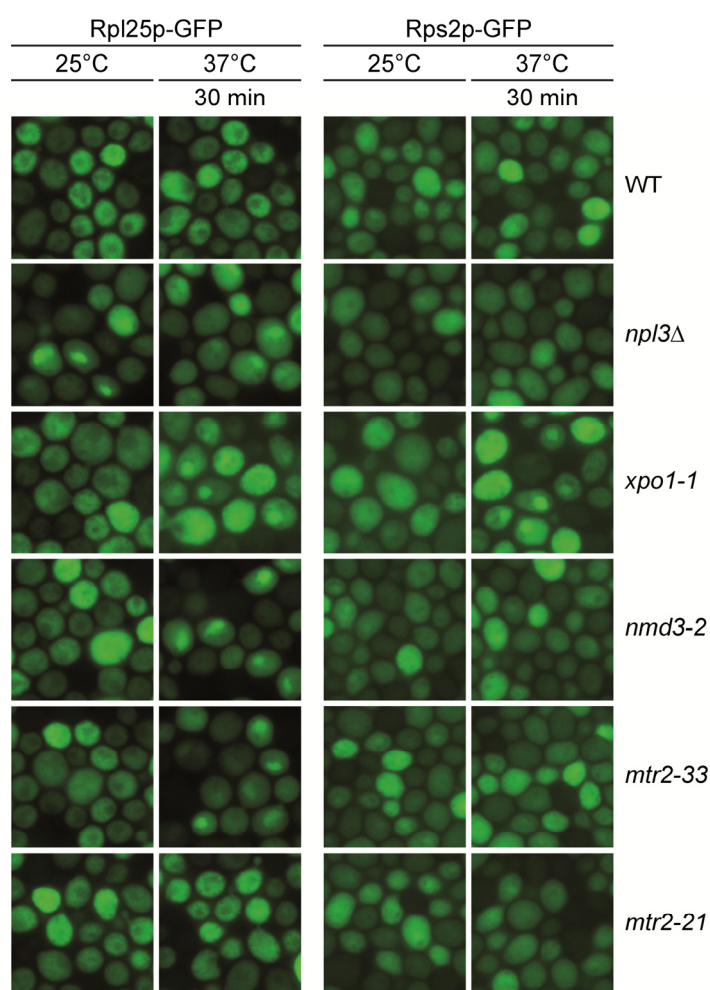


Abbildung 18: Die Deletion von *NPL3* im *S. cerevisiae* BY-Stammhintergrund führt zu Exportdefekten der prä-60S-Untereinheit, wohingegen der Export der prä-40S-Untereinheit unbeeinflusst ist.

Für die Lokalisationsanalysen wurden Wildtyp (WT), *npl3Δ*, die mRNA-Exportmutante *mtr2-21*, die prä-60S-Exportmutanten *nmd3-2* und *mtr2-33* sowie *xpo1-1*, die zusätzlich prä-40S-Exportdefekte aufweist, bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, anschließend geteilt und entweder bei 25°C oder für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Lokalisationen der Reporterproteine der großen prä-ribosomalen Untereinheit (prä-60S), Rpl25p-GFP, sowie der kleinen prä-ribosomalen Untereinheit (prä-40S), Rps2p-GFP, mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

Neben der Exportfunktion der prä-60S-Untereinheit transportiert Mtr2p ebenso die mRNA in das Zytoplasma. Interessanterweise wurde eine weitere Mutante von *MTR2*, *mtr2-21*, beschrieben, welche im Gegensatz zu *mtr2-33* keine Exportdefekte der prä-60S-

Untereinheit, jedoch mRNA-Exportdefekte aufweist, die in *mtr2-33* nicht auftreten (Bassler *et al.*, 2001) (Abb. 18). Die Analyse der Lokalisation von Rpl25p-GFP in *npl3Δ* zeigt, dass im Gegensatz zu Wildtyp sowohl bei 25°C als auch nach Inkubation von 30 min bei 37°C das Reporterprotein der prä-60S-Untereinheit im Zellkern akkumuliert. Demzufolge wird durch die Deletion von *NPL3* der Transport der prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma inhibiert. Im Gegensatz dazu ist der Export der prä-40S-Untereinheit in *npl3Δ* unverändert (Abb. 18). Das Reporterprotein der prä-40S-Untereinheit, Rps2p-GFP, liegt in *npl3Δ* und in Wildtyp im Gegensatz zu *xpo1-1* nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C im Zytoplasma und im Zellkern gleichmäßig verteilt vor (Abb. 18).

Neben Xpo1p sind die beiden Proteine Mtr2p und Nmd3p als Adapterproteine der prä-60S-Untereinheit an deren Export beteiligt. Daher ist in den temperatursensitiven Mutanten *nmd3-2* und *mtr2-33* nach einer Inkubation bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C Rpl25p-GFP im Zellkern misslokalisiert (Bassler *et al.*, 2001) (Abb. 18).

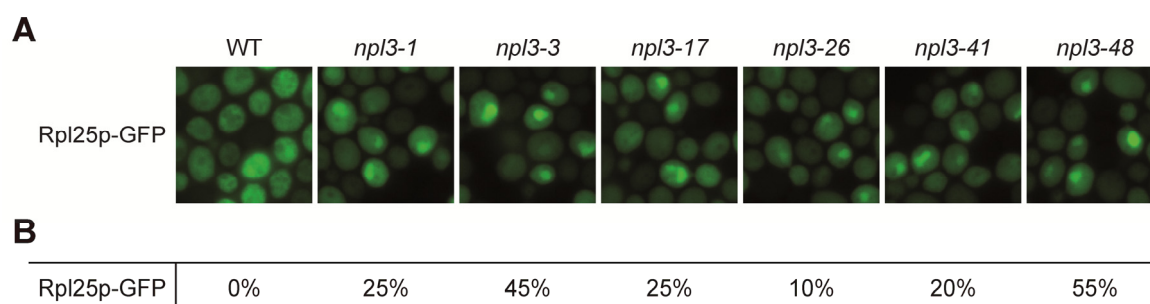


Abbildung 19: Mutationen in *NPL3* führen im *S. cerevisiae* *S288C*-Stammhintergrund zu Exportdefekten der prä-60S-Untereinheit.

Die Lokalisation des Reporterproteins der großen prä-ribosomalen Untereinheit (prä-60S), Rpl25p-GFP, in Wildtyp (WT) sowie den temperatursensitiven *npl3*-Mutanten, *npl3-1*, *npl3-3*, *npl3-17*, *npl3-26*, *npl3-41* und *npl3-48*, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurde nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert (A) und die nukleäre Misslokalisation von ca. 500 ausgezählten Hefezellen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten quantifiziert (B).

Zur Aufklärung einer generellen Funktion von Npl3p beim Transport der prä-60S-Untereinheit wurde die Lokalisation von Rpl25p-GFP ebenso in *npl3*-Mutanten im essentiellen *S288C*-Stammhintergrund analysiert. Dazu wurden Lokalisationsstudien von Rpl25p-GFP in den temperatursensitiven Mutanten *npl3-1*, *npl3-3*, *npl3-17*, *npl3-26*, *npl3-41* und *npl3-48* durchgeführt. Diese Mutanten weisen sowohl bei 25°C (Daten nicht gezeigt) als auch nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C eine nukleäre Akkumulation des Reporterproteins auf (Abb. 19A). Dieser Exportdefekt ist jedoch in den einzelnen *npl3*-Mutanten unterschiedlich stark ausgeprägt (Abb. 19B). Die auftretenden Exportdefekte zeigen, dass *NPL3* sowohl im *BY*- als auch im *S288C*-Stammhintergrund am

Transport der prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma beteiligt ist (Abb. 18 und Abb. 19A).

Es ist allerdings unklar, ob dieser Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit ein durch das Fehlen von *NPL3* hervorgerufener direkter oder indirekter Effekt ist. Für die Charakterisierung der direkten Beteiligung von Npl3p am Export der prä-60S-Untereinheit wurden zunächst Lokalisationsstudien mit der zytoplasmatisch lokalisierten Variante von Npl3p-GFP, npl3_cp-GFP, in *nmd3-2* und *mtr2-33* durchgeführt. Diese zeigen, dass npl3_cp-GFP in den beiden prä-60S-Exportmutanten nach einer Inkubation für 30 min oder 3 h bei 37°C im Zellkern akkumuliert (Abb. 20). Die Intensität und die Anzahl der Hefezellen mit einer nukleären Lokalisation nehmen mit steigender Inkubationsdauer zu, da aufgrund der Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit somit ebenso der Transport von npl3_cp-GFP in das Zytoplasma blockiert wird. Zusätzlich wurde die Mutante *mtr2-21*, die ausschließlich mRNA-Exportdefekte aufweist, für die Lokalisationsstudien verwendet. Diese wies ebenso nach einer Inkubation von 30 min oder 3 h bei 37°C, welche allerdings aufgrund des mRNA-Exportdefektes, eine Misslokalisierung von npl3_cp-GFP im Zellkern auf (Abb. 20).

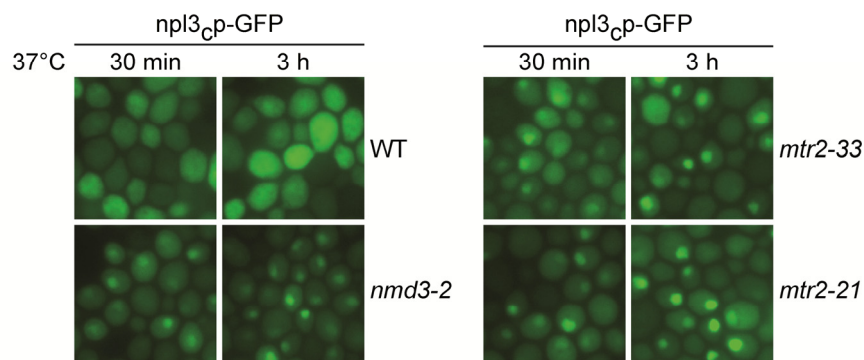


Abbildung 20: Der Export von Npl3p ist mit dem der prä-60S-Untereinheit gekoppelt.

Die Lokalisation der Mutante von Npl3p-GFP, npl3_cp-GFP, in Wildtyp (WT), den prä-60S-Exportmutanten *nmd3-2* und *mtr2-33* sowie der mRNA-Exportmutante *mtr2-21*, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nach einer Inkubation von 30 min bzw. 3 h bei 37°C analysiert.

Des Weiteren sollte die vermeintliche Funktion von Npl3p beim Export der prä-60S-Untereinheit durch genetische Analysen von *NPL3* mit den Exportfaktoren *NMD3*, *MTR2* und *XPO1* bekräftigt werden. Über Kreuzung von *npl3Δ* mit *nmd3-2* bzw. *mtr2-33* und anschließender Tetradendisektion wurden die Hefestämme *npl3Δ nmd3-2* und *npl3Δ mtr2-33* in Anwesenheit eines *NPL3*-exprimierenden Plasmides hergestellt und deren Wachstum auf -URA- bzw. FOA-Agarplatten überprüft. Als zusätzliche Kontrolle wurde der Hefestamm mit einer kombinierten Deletion von *NPL3* und der *MTR2*-Mutante,

mtr2-21, hergestellt. Die Wachstumsanalyse auf FOA-Agarplatten, auf denen nur Hefezellen wachsen, die das *NPL3*-exprimierende Plasmid verloren haben, zeigt, dass die Kombination von *npl3Δ* sowohl mit *nmd3-2* als auch mit *mtr2-33* zur starken Inhibierung des Wachstums führt und die Kombination von *npl3Δ* mit *xpo1-1* eine synthetische Letalität aufweist (Abb. 21). Im Vergleich dazu wachsen die Einzelmутanten *npl3Δ*, *xpo1-1*, *nmd3-2* und *mtr2-33* auf FOA-Agarplatten ähnlich wie Wildtyp, so dass die genetische Interaktion von *NPL3* mit *XPO1*, *NMD3* bzw. *MTR2* ersichtlich wird. Die entsprechenden -URA-Agarplatten wiesen ein ähnliches Wachstum der Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp und den Einzelmутanten auf (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise zeigt *npl3Δ mtr2-21*, obwohl dieser im Vergleich zu den Einzelmутanten *npl3Δ* und *mtr2-21* Wachstumsdefekte aufweist, eine zu *npl3Δ mtr2-33* höhere Wachstumsrate (Abb. 21).

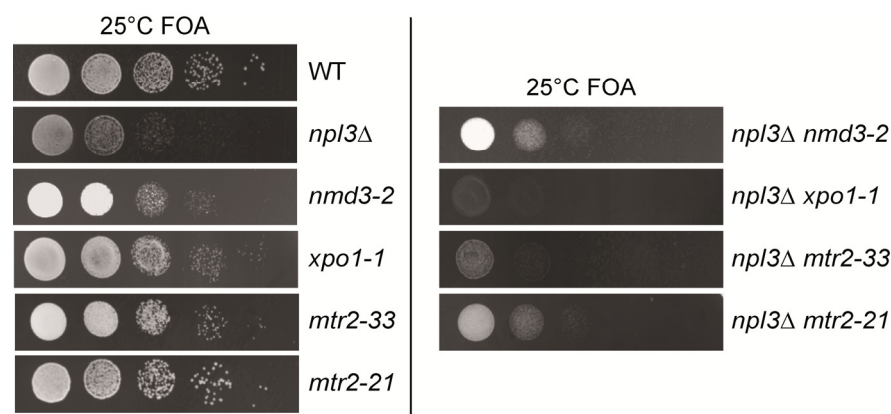


Abbildung 21: Die Transportfaktoren *XPO1*, *MTR2* und *NMD3* der prä-60S-Untereinheit interagieren genetisch mit *NPL3*.

Das Wachstum von Wildtyp (WT), den Einzelmутanten *npl3Δ*, *nmd3-2*, *xpo1-1*, *mtr2-33* und der mRNA-Exportmutante *mtr2-21* wurde im Vergleich zu den *npl3Δ*-Doppelmutanten auf FOA-Agarplatten nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 25°C analysiert.

Zur Charakterisierung und Bestimmung des Zeitpunktes einer direkten Assoziation von Npl3p an die prä-60S-Untereinheit wurden Ko-IP's durchgeführt. Für den Nachweis einer möglichen nukleären Assoziation wurde zunächst eine Ko-IP mit Rix1p durchgeführt. Rix1p ist ein essentielles Protein des Rix1-Komplexes, der aus Rix1p, Ipi1p, Ipi2p und Ipi3p zusammengesetzt ist und für die Prozessierung der 35S rRNA benötigt wird (Gadal *et al.*, 2001; Nissan *et al.*, 2004). Rix1p assoziiert in Zellkernkörperchen mit dem prä-90S-Ribosom und transportiert die prä-66S-Untereinheit nach der Spaltung des prä-90S-Ribosoms in die prä-44S- und prä-66S-Untereinheit in den Zellkern. Rix1p dissoziiert während den weiteren nukleären Prozessierungsschritten von der prä-60S-Untereinheit,

bevor die prä-60S-Untereinheit weiter in das Zytoplasma transportiert wird (Nissan *et al.*, 2002; Nissan *et al.*, 2004).

Die Ko-IP von Rix1p-GFP zeigt eine direkte und RNA-unabhängige Interaktion von Npl3p mit Rix1p, da sowohl mit als auch ohne RNase-Behandlung der Lysate Npl3p im Western Blot in den Eluaten nachweisbar ist (Abb. 22A). Im Gegensatz dazu ist die als Kontrollprotein verwendete Ferrochelataase Hem15p in den Eluaten nicht detektierbar. Zusätzlich wurde eine Ko-IP von dem nicht-essentiellen Protein Arx1p-TAP, welches unterstützend an der Prozessierung der prä-60S-Untereinheit beteiligt ist und diese in das Zytoplasma transportiert, durchgeführt (Lebreton *et al.*, 2006; Bradatsch *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008). Die Ko-IP zeigt eine spezifische Assoziation von Npl3p mit Arx1p, da Npl3p ebenso in den Eluaten ohne bzw. mit RNase-Behandlung detektierbar ist, während das Kontrollprotein Hem15p nicht nachweisbar ist. (Abb. 22B). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Npl3p sowohl mit dem Exportfaktor Nmd3p als auch mit dem ribosomalen Protein Rpl25p, als zwei weitere Komponenten der prä-60S-Untereinheit, physikalisch interagiert (Daten von Alexandra Hackmann, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung).

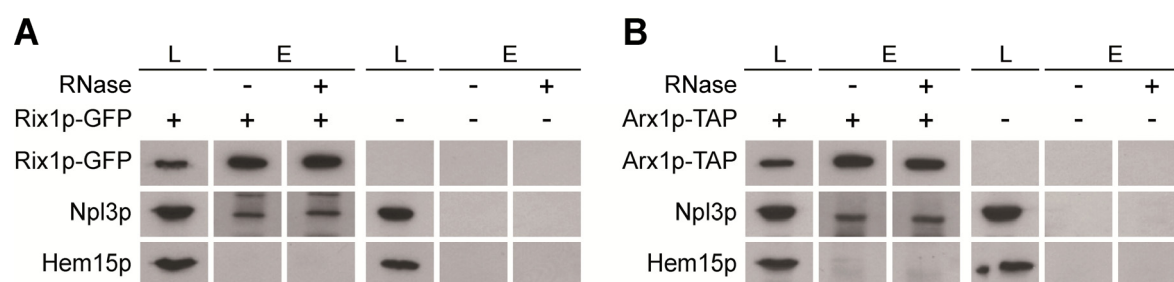


Abbildung 22: Npl3p interagiert physikalisch sowohl mit dem in der Biogenese der prä-60S-Untereinheit involvierten Protein Rix1p, als auch mit dem im prä-60S-Export involvierten Protein Arx1p.

Die *in vivo* Interaktion von Npl3p mit der prä-60S-Untereinheit wurde in Wildtyp durch eine Ko-IP von Rix1p-GFP mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers (A) bzw. durch eine Ko-IP von Arx1p-TAP mit Hilfe eines Isotyp-spezifischen Antikörpers (B) mittels Western Blot analysiert. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen GFP, Npl3p bzw. Hem15p verwendet. Da der sekundäre Antikörper gegen Kaninchen das Protein A bindet, war dieser ausreichend für die Detektion des TAP-Anhangs (L = Lysat, E = Eluat).

Npl3p ist somit zum einen zusammen mit dem Ribosomenbiogenesefaktor Rix1p, der bereits im Zellkernkörperchen mit dem prä-90S-Ribosom assoziiert, an dem prä-60S-Ribosom detektierbar und zum anderen ebenso wie Rix1p im Zellkernkörperchen lokalisiert (Russell und Tollervey, 1995; Singleton *et al.*, 1995). Daraufhin stellte sich die Frage, ob Npl3p ebenso zu einem frühen Zeitpunkt mit dem prä-90S-Ribosom im Zellkernkörperchen assoziiert ist oder erst im Zellkern an das prä-60S-Ribosom rekrutiert wird. Dazu wurde eine Ko-IP von Npl3p durchgeführt und anschließend die assoziierten rRNA-Typen

mittels sequenzspezifischer RT-PCR analysiert. Im Gegensatz zu dem Exportprotein Nmd3p, dass nicht im Zellkernkörperchen sondern erst im Zellkern an das prä-60S-Ribosom rekrutiert wird und ausschließlich mit dem 25S rRNA enthaltenen prä-60S-Ribosom assoziiert, interagiert Npl3p über das prä-90S-Ribosom mit der 35S rRNA (Daten von Alexandra Hackmann, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung).

Da die beiden RRM's von Npl3p an GU-reichen RNA-Strukturen binden können (Deka *et al.*, 2008), wurde eine mögliche direkte Interaktion von Npl3p mit der 25S rRNA analysiert. Dazu wurde eine *in vitro* Ko-IP von rekombinant hergestelltem, mit einem myc- und HIS-Anhang gekoppeltem Npl3 (HIS-myc-Npl3) mit drei verschiedenen, *in vitro* transkribierten rRNA-Fragmenten der 25S rRNA durchgeführt (Abb. 23A). Anschließend wurden die an das HIS-myc-Npl3 gebundenen rRNA-Fragmente mittels sequenzspezifischer RT-PCR amplifiziert und über ein Agarosegel detektiert. Npl3 bindet demnach nicht nur mRNA, sondern kann ebenso *in vitro* die drei GU-reichen 25S rRNA-Fragmente binden (Abb. 23B). Die Spezifität von Npl3 zur RNA wird in der Ko-IP von HIS-myc-Npl3 mit den korrespondierenden, über PCR amplifizierten rDNA's ersichtlich, da Npl3 nicht an diese rDNA's bindet.

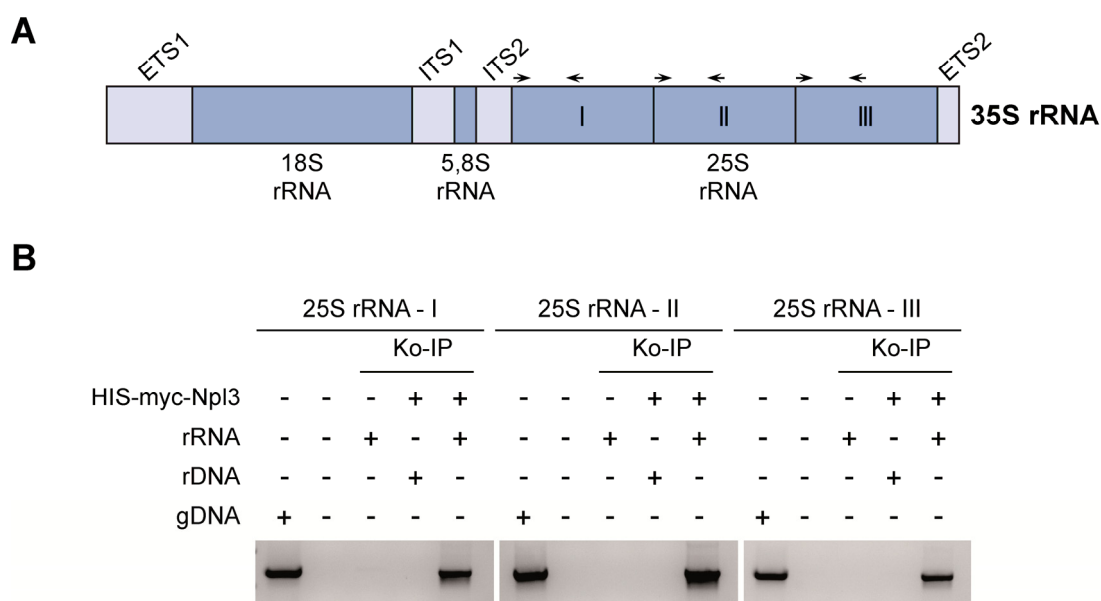


Abbildung 23: Npl3 bindet *in vitro* direkt die 25S rRNA.

(A) Die 25S rRNA ist neben der 18S rRNA und der 5,8S rRNA Teil der 35S rRNA. In der schematischen Darstellung der 35S rRNA sind neben den rRNA-Typen, den nicht-kodierenden Regionen, die als *internal transcribed spacer* (ITS) und *external transcribed spacer* (ETS) bezeichnet werden, ebenso die untersuchten Fragmente der 25S rRNA für die *in vitro* Transkription sowie die verwendeten Primer für die RT-PCR (Pfeile) gekennzeichnet. (B) Die Bindung der drei *in vitro* transkribierten 25S rRNA-Fragmente an Npl3 wurde durch eine Ko-IP von rekombinant exprimiertem HIS-myc-Npl3 mit Hilfe eines myc-spezifischen Antikörpers und einer anschließenden RT-PCR unter Verwendung spezifischer Primer nachgewiesen. Als Kontrolle für die PCR wurde genomische DNA (gDNA) von Wildtyp verwendet, welche die tandemartig angeordneten Genkopien der 35S rDNA enthielt. Die durch PCR amplifizierten rDNA-Fragmente dienten als Kontrolle für unspezifische Bindung von Npl3.

Npl3p fungiert beim mRNA-Export als Adapterprotein zwischen der mRNA und dem Exportrezeptorheterodimer Mex67p-Mtr2p durch die direkte Interaktion mit Mex67p. Da Mex67p ebenfalls die prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma transportiert (Yao *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2008), wäre eine Funktion von Npl3p als Adapter zwischen Mex67p und der prä-60S-Untereinheit denkbar. Zur Überprüfung, ob die Deletion von *NPL3* zu einer Verringerung oder zu einem Verlust der Interaktion zwischen Mex67p und der prä-60S-Untereinheit führt, wurde diese Möglichkeit mit Hilfe einer Ko-IP von Rpl25p-myc mit Mex67p-GFP in Wildtyp und *npl3Δ* analysiert (Abb. 24). Die Ko-IP bestätigte die Interaktion von Npl3p mit der prä-60S-Untereinheit, da Npl3p unabhängig von der RNase-Behandlung in den Eluatn detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist in *npl3Δ* keine verringerte Interaktion zwischen Rpl25p-myc und Mex67p-GFP sichtbar, so dass Npl3p nicht als Adapterprotein zwischen Mex67p und der prä-60S-Untereinheit fungiert. Zusätzlich wurde mit einer Ko-IP von Nmd3p und Rpl25p gezeigt, dass Npl3p ebenso nicht als Adapterprotein für das Exportrezeptorheterodimer Nmd3p-Xpo1p notwendig ist (Daten von Alexandra Hackmann, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung).

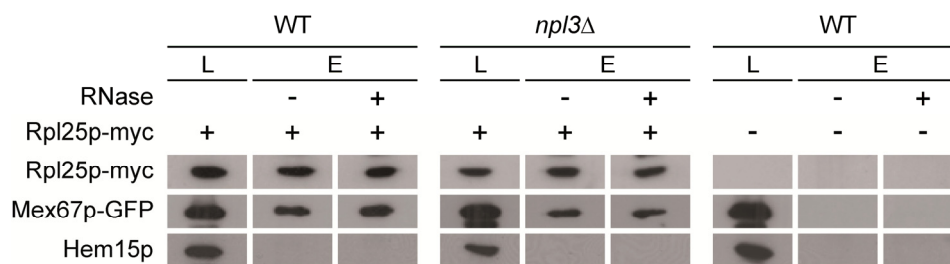


Abbildung 24: Die Deletion von *NPL3* hat keinen Einfluss auf die Interaktion von Mex67p mit der ribosomalen prä-60S-Untereinheit.

Die *in vivo* Interaktion von Mex67p mit der prä-60S-Untereinheit wurde in Wildtyp (WT) und in *npl3Δ* durch eine Ko-IP von Rpl25p-myc mit Hilfe eines myc-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot analysiert. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen myc, GFP bzw. Hem15p verwendet (L = Lysat, E = Eluat).

Jedoch ist unklar, ob Npl3p den Translokationsprozess der prä-60S-Untereinheit durch den NPC aktiv vermittelt. Eine unterstützende Funktion von Npl3p könnte über das NPC-assoziierte Protein Sac3p erfolgen, da Sac3p bereits den Export von mRNP's beteiligt ist (Lei *et al.*, 2003; Chekanova *et al.*, 2008). Zur Untersuchung dessen wurden Lokalisationsstudien von Rpl25p-GFP in *sac3Δ* durchgeführt. Hefezellen mit der Deletion von *SAC3* zeigen vergleichbar zu *npl3Δ* eine nukleäre Misslokalisierung von Rpl25p-GFP, so dass demzufolge Npl3p den Transport der prä-60S-Untereinheit durch den NPC mit Hilfe von Sac3p unterstützen könnte (Abb. 25).

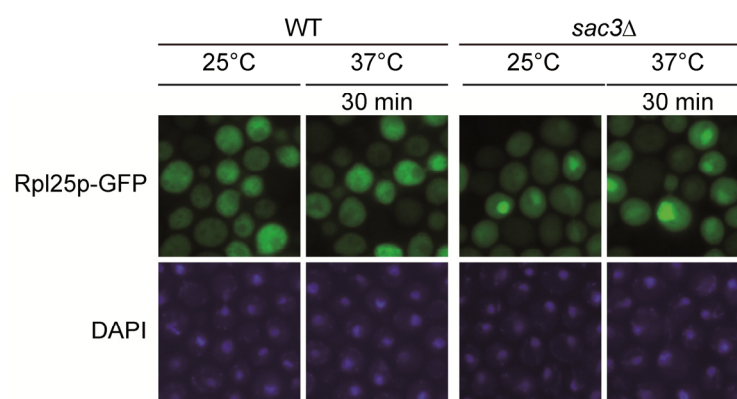


Abbildung 25: Die Deletion von *SAC3* im *S. cerevisiae* BY-Stammhintergrund führt zu Exportdefekten der prä-60S-Untereinheit.

Für die Lokalisationsanalysen wurden Wildtyp (WT) und *sac3Δ* bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, anschließend geteilt und entweder bei 25°C oder für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lokalisation des Reporterproteins der großen prä-ribosomalen Untereinheit (prä-60S), Rpl25p-GFP, mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

4.4 Die Überexpression von *MTR2* und *NMD3* supprimiert den Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ*

Aufgrund der frühzeitigen und kontinuierlichen Assoziation von Npl3p mit der prä-60S-Untereinheit beim Export dieser in das Zytoplasma (Abb. 21 und Abb. 22) stellte sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt Npl3p von der prä-60S-Untereinheit dissoziiert und ob Npl3p bei der Prozessierung der prä-60S-Untereinheit eine Funktion besitzt. Daher wurde der Effekt der Überexpression der beiden Exportrezeptoren *MTR2* und *NMD3* auf den vorhandenen Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* analysiert. Dazu wurden Lokalisationsstudien von Rpl25p-GFP in Anwesenheit eines *MTR2*- oder *NMD3*-exprimierenden 2μ -Plasmides, welches in hoher Kopienzahl in den Hefezellen vorliegt, durchgeführt. Das Reporterprotein, Rpl25p-GFP, weist in *npl3Δ* mit einer Überexpression von *MTR2* oder *NMD3* ähnlich wie in Wildtyp mit einem Leervektor (2μ) eine gleichmäßige Verteilung im Zellkern und im Zytoplasma auf, wohingegen *npl3Δ* mit einem Leervektor (2μ) eine Akkumulation von Rpl25p-GFP im Zellkern zeigt (Abb. 26A). Demzufolge führt die Überexpression von *MTR2* oder *NMD3* in *npl3Δ* zu einer vollständigen Suppression der Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit.

Die durch Überexpression von *MTR2* und *NMD3* hervorgerufene Aufhebung der Exportdefekte von *npl3Δ* könnte ebenso zur Suppression der Wachstumsdefekte führen. Zur Überprüfung dessen wurde zunächst das Wachstum von *npl3Δ* in Anwesenheit eines *MTR2*- oder *NMD3*-überexprimierenden Plasmides in einer seriellen Verdünnung auf Selektionsagarplatten analysiert (Abb. 26B). In *npl3Δ* führt eine Überexpression von *MTR2* bzw. *NMD3* im Vergleich zu *npl3Δ* mit einem Leervektor sowohl bei 25°C als auch

bei 37°C zu einem leicht verbesserten Wachstum. Allerdings ist die Wachstumsrate nicht vergleichbar mit der von Wildtyp, so dass das Wachstum vermutlich durch zusätzliche Defekte verringert wird.

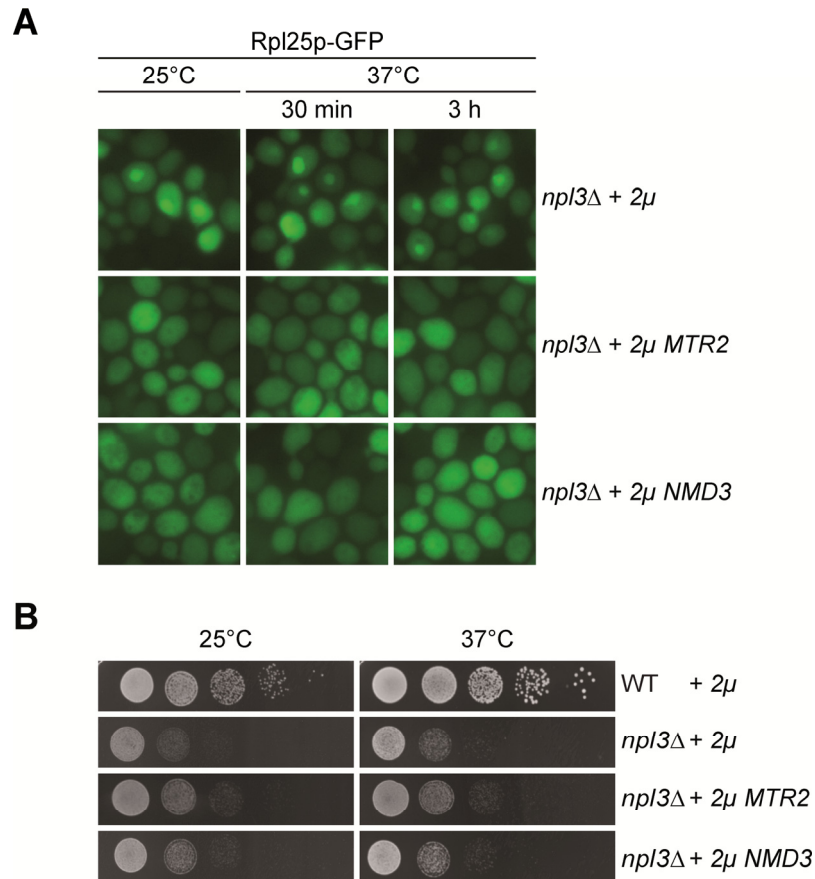


Abbildung 26: Die Überexpression von *NMD3* und *MTR2* führt zu einer Aufhebung der prä-60S-Exportdefekte in *npl3Δ*, jedoch nicht zu einer vollständigen Suppression der Wachstumsdefekte in *npl3Δ* im Vergleich zum Wildtyp.

(A) Die Lokalisation des Reporterproteins der großen prä-ribosomalen Untereinheit (prä-60S), Rpl25p-GFP wurde in *npl3Δ* in Anwesenheit eines Leervektors (*2μ*) bzw. in *npl3Δ* mit einem *MTR2*- oder *NMD3*-Überexpressionsplasmid bei 25°C und nach einer Inkubation von 30 min bzw. 3 h bei 37°C mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. (B) Das Wachstum von Wildtyp (WT) und *npl3Δ* in Anwesenheit eines Leervektors (*2μ*) bzw. von *npl3Δ* mit einem *NMD3*- oder *MTR2*-Überexpressionsplasmid wurde nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 25°C bzw. 37°C auf Selektionsagarplatten analysiert.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die Reduktion der Translationsrate in *npl3Δ* durch die Überexpression von *MTR2* oder *NMD3* aufgehoben werden kann. Dafür wurden die Hefestämme mit radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Methionin inkubiert und die mittels Translation synthetisierten Proteine audioradiographisch detektiert. Trotz des durch die Überexpression von *MTR2* und *NMD3* wiederhergestellten Exports der prä-60S-Untereinheit weist *npl3Δ* im Vergleich zu einem Leervektor keine signifikante Erhöhung der Translationsrate auf (Abb. 27A). Sowohl bei 25°C als auch bei 37°C zeigt die Quantifizierung der Translationsrate von *npl3Δ* mit der Überexpression von *MTR2* oder *NMD3* im Vergleich zu *npl3Δ* mit einem Leervektor ähnliche Werte (Abb. 27B). Zur

Analyse, ob ein Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit unmittelbar zu Translationsdefekten führt, wurde die *de novo* Proteinbiosynthese in einer *XPO1*-Mutante untersucht. Die temperatursensitive Mutante *xpo1-1* weist bei einer Inkubation bei 37°C Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit auf (Gadal *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu *npl3Δ* zeigt *xpo1-1*, obwohl die Translation bei 25°C und 37°C im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert ist, keine signifikanten Translationsdefekte (Abb. 27A und Abb. 27B). Demzufolge führt ein Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit nicht unmittelbar zu Translationsdefekten.

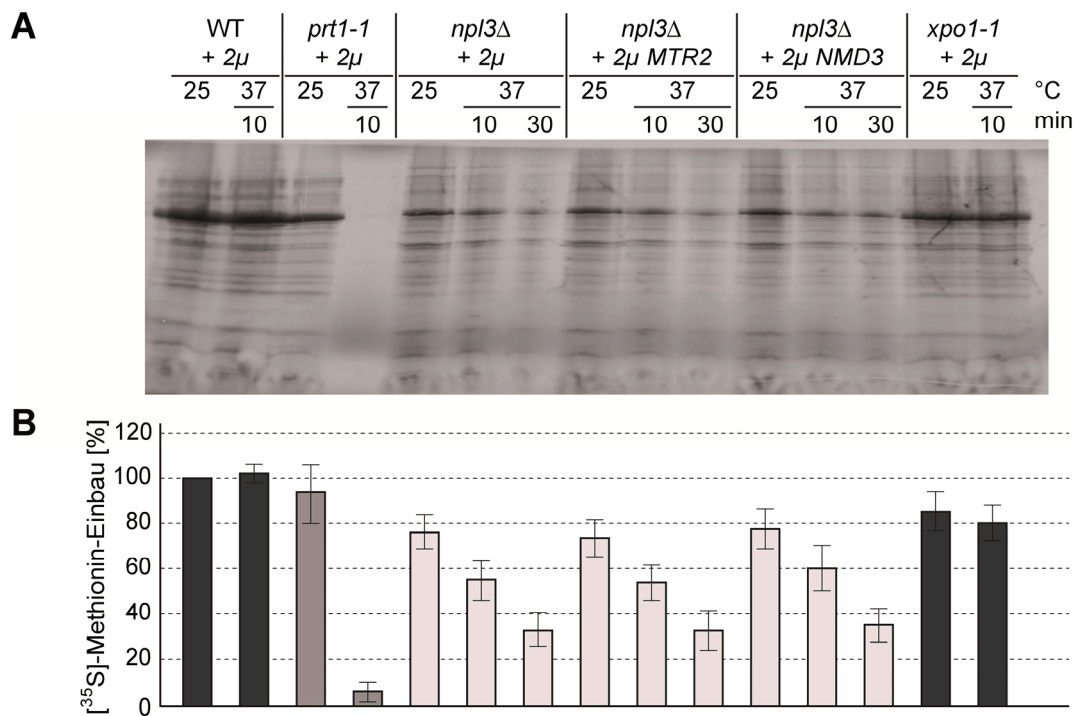


Abbildung 27: Eine Suppression der prä-60S-Exportdefekte durch die Überexpression von *MTR2* bzw. *NMD3* führt nicht zu einer erhöhten Translationsrate in *npl3Δ*.

Für die Analyse der *de novo* Proteinbiosynthese wurden Wildtyp (WT), die Translationsinitiationsmutante *prt1-1* sowie die im Export beider ribosomaler Untereinheiten defiziente Mutante *xpo1-1* in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) sowie von *npl3Δ* in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) bzw. eines Plasmides, welches entweder *NMD3* oder *MTR2* überexprimierte, in Methionin-freiem Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, anschließend geteilt und entweder bei 25°C oder für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Methionin wurde dessen Einbau in die synthetisierten Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE autoradiographisch analysiert (A) und anschließend von 10 unabhängigen Experimenten quantifiziert (B).

4.5 Der Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* wird nicht durch Prozessierungsdefekte hervorgerufen

Eine defekte Ribosomenbiogenese verhindert mit Hilfe zahlreicher Kontrollmechanismen den Export der prä-ribosomalen Untereinheiten in das Zytoplasma. Daher könnte die beobachtete nukleäre Misslokalisierung von Rpl25p-GFP in *npl3Δ* aufgrund der frühen Rekrutierung von Npl3p an die rRNA durch Ribosomenbiogenesedefekte hervorgerufen

werden. Zur Überprüfung dessen wurde der Effekt der Überexpression von *MTR2* und *NMD3* auf den Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in der temperatursensitiven Ribosomenbiogenesemutante *rix1-1* analysiert. Die Überexpression von *MTR2* oder *NMD3* führt in *rix1-1* im Gegensatz zu *npl3Δ* zu keiner veränderten Lokalisation von Rpl25p-GFP (Abb. 28). Demzufolge wird durch eine erhöhte Expression von Exportfaktoren der Transport von unreifen prä-60S-Untereinheiten in das Zytoplasma weiterhin verhindert.

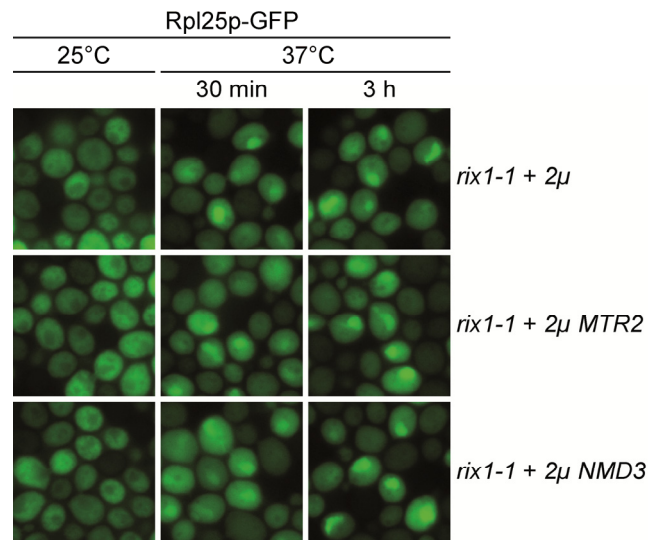


Abbildung 28: Die Überexpression von *NMD3* oder *MTR2* führt nicht zu einer Aufhebung der prä-60S-Exportdefekte in der Ribosomenbiogenesemutante *rix1-1*.

Die Lokalisation des Reporterproteins der großen prä-ribosomalen Untereinheit (prä-60S), Rpl25p-GFP, wurde in *rix1-1* in Anwesenheit eines Leervektors (*2μ*) bzw. von *rix1-1* mit einem *NMD3*- oder *MTR2*-Überexpressionsplasmid bei 25°C und nach einer Inkubation von 30 min bzw. 3 h bei 37°C mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

Darüber hinaus wurden die genetischen Interaktionen von *NPL3* mit den Genen *RPA12*, *RPA14* oder *RPA49*, die für Komponenten der RNA-Polymerase I kodieren und daher für die Synthese der 35S rRNA benötigt werden, sowie mit *RIX1* untersucht. Über Kreuzung von *npl3Δ* mit *rpa12Δ*, *rpa14Δ*, *rpa49Δ* bzw. *rix1-1* und anschließender Tetraden-dissektion wurden die Hefestämme *npl3Δ rpa12*, *npl3Δ rpa14*, *npl3Δ rpa49* und *npl3Δ rix1-1* in Anwesenheit eines *NPL3*-exprimierenden Plasmides hergestellt und deren Wachstum auf -URA- bzw. FOA-Agarplatten überprüft. Die Wachstumsanalyse auf FOA-Agarplatten zeigt, dass die Kombination von *npl3Δ* sowohl mit *rpa12Δ*, mit *rpa14Δ* als auch mit *rpa49Δ* zu keinem reduzierten Wachstum führt (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu *npl3Δ xpo1-1* ist *npl3Δ rix1-1* nicht synthetisch letal (Daten nicht gezeigt). Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass der Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* durch Ribosomenbiogenesedefekte entsteht.

4.6 Npl3p ist nicht an der Prozessierung der prä-60S- zur 60S-Untereinheit involviert

Da durch die Wiederherstellung des Transports der prä-60S-Untereinheit mittels Überexpression von *MTR2* oder *NMD3* weder eine Erhöhung der Translationsrate noch eine vollständige Suppression der Wachstumsdefekte von *npl3Δ* erzielt wird, besitzt Npl3p vermutlich mindestens eine weitere Funktion vor oder während der Translation. Eine mögliche Erklärung für die beständigen Translationsdefekte wäre eine fehlerhafte Reifung der prä-60S-Untereinheit. Nachdem die prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma transportiert wurde, erfolgen zahlreiche Prozessierungsschritte, wie z.B. die Dissoziation der Exportfaktoren Mtr2p, Mex67p, Xpo1p und Nmd3p, bis letztendlich die reife, funktionsfähige 60S-Untereinheit entstanden ist (siehe Einleitung 1.5). Ein wichtiger Schritt ist die miteinander gekoppelte Dissoziation von Nmd3p und Assoziation von Rpl10p an bzw. von der prä-60S-Untereinheit. Dabei wird Rpl10p, das im Zytoplasma an das Chaperon Sgt1p bindet, mit Hilfe der GTPase Lsg1p an die prä-60S-Untereinheit rekrutiert, woraufhin Nmd3p von dem Partikel dissoziiert.

Zur Aufklärung einer etwaigen Funktion von Npl3p bei der zytoplasmatischen Prozessierung wurde eine mögliche genetische Interaktion von *NPL3* mit *LSG1* und *RPL10* untersucht. Dazu wurden Hefestämme, die sowohl *npl3Δ* als auch *lsg1-* bzw. *rpl10-* Mutationen besitzen, über die Kreuzung der Einzelmutationsstämme und anschließender Tetradendissektion hergestellt. Die Wachstumsanalyse der hergestellten Hefestämme auf Selektionsagarplatten zeigt, dass die Kombination von *npl3Δ* mit *lsg1-2* oder *lsg1-3* im Vergleich zu den Einzelmutanten zu einer starken Wachstumsinhibierung führt, wobei *npl3Δ lsg1-3* eine synthetische Letalität aufweist (Abb. 29). Das Wachstum von *npl3Δ rpl10(F85S)* ist im Vergleich zu den Einzelmutanten stark reduziert und *npl3Δ rpl10(G161D)* ist synthetisch letal (Abb. 29). Neben dieser genetischen Interaktion von *npl3Δ* mit den beiden *rpl10*-Mutanten führt eine verringerte Expression von *RPL10* in *npl3Δ* zu einem erhöhten Wachstumsdefekt (Daten nicht gezeigt; Gross *et al.*, in Vorbereitung).

Nachdem das Start-Kodon von dem 43S-Komplex an der mRNA gefunden wurde und sich der 48S-Komplex, bestehend aus der 40S-Untereinheit, der mRNA, der Initiator-tRNA sowie weiteren Initiationsfaktoren, gebildet hat, assoziiert die 60S-Untereinheit mit dem 48S-Komplex (siehe Einleitung 1.8). Bei diesem Prozess des *Subunit Joinings* verbinden sich die 40S- und die 60S-Untereinheit zu einem funktionellen 80S-Ribosom (Monosom).

Neben der GTPase Fun12p (eIF5B) besitzt zusätzlich Rpl10p wichtige Funktionen beim *Subunit Joining* und wird daher für die generelle Translationsinitiation benötigt. Die GTPase-Aktivität von Fun12p katalysiert unter anderem die Bindung der Initiator-tRNA an das 40S-Ribosom. Die Deletion des nicht-essentiellen Genes *FUN12* führt zu Wachstumsdefekten vergleichbar mit denen von *npl3Δ* (Abb. 29). Mit Hilfe der hergestellten Doppelmutante *npl3Δ fun12Δ* sollte eine mögliche genetische Interaktion zwischen beiden Genen analysiert werden. Dazu wurde das Wachstum von *npl3Δ fun12Δ* mit einem *NPL3*-exprimierenden Plasmid auf FOA-Agarplatten analysiert. Die Doppelmutante zeigt kein Wachstum auf FOA-Agarplatten, so dass demzufolge die Deletionen beider Gene zur synthetischen Letalität führt (Abb. 29).

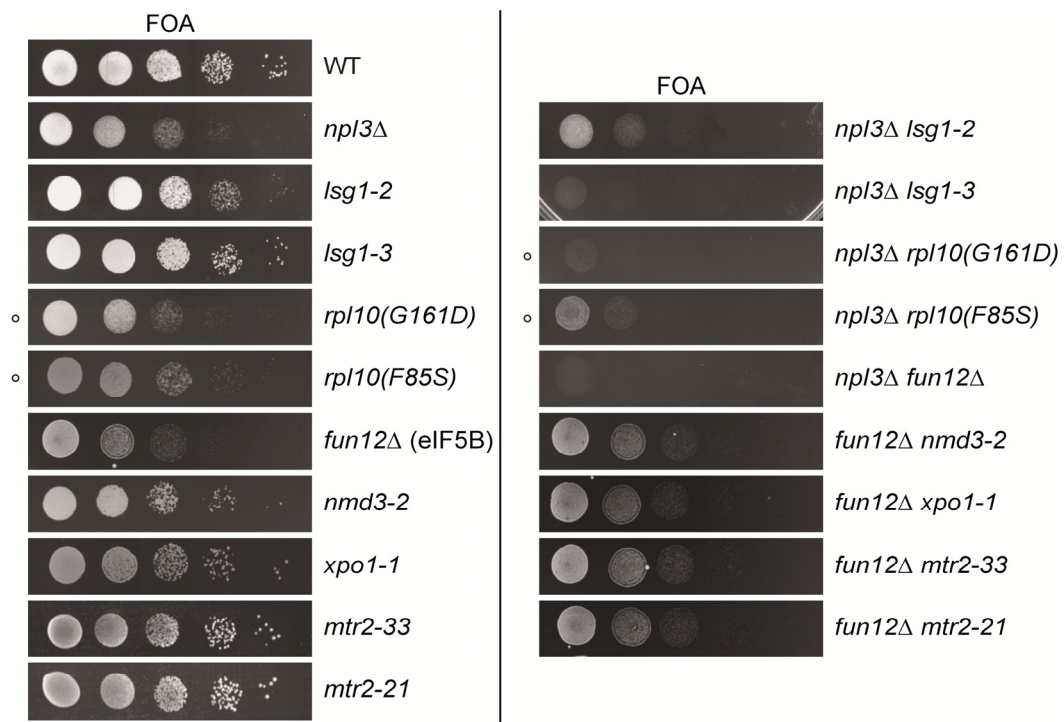


Abbildung 29: *NPL3* zeigt eine genetische Interaktion mit dem an der zytoplasmatischen Reifung der prä-60S-Untereinheit involvierten *LSG1* sowie mit den am *Subunit Joining* beteiligten *RPL10* und *FUN12*, wohingegen andere prä-60S-Exportfaktoren, wie *NMD3*, *MTR2* oder *XPO1*, keine genetische Interaktion mit *FUN12* aufweisen.

Das Wachstum von Wildtyp (WT), *npl3Δ*, den beiden Mutanten der GTPase *LSG1*, *lsg1-2* und *lsg1-3*, *fun12Δ*, *nmd3-2*, *xpo1-1*, *mtr2-33* sowie der mRNA-Exportmutante *mtr2-21* wurde im Vergleich zu den *npl3Δ*-Doppelmutanten auf FOA-Agarplatten, die auf den Verlust des *NPL3*-exprimierenden Plasmides selektionieren, bzw. *fun12Δ*-Doppelmutanten auf FOA-Agarplatten nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 25°C analysiert. Die Wachstumsanalyse der beiden *rpl10*-Mutanten, *rpl10(G161D)* und *rpl10(F85S)*, sowie deren Doppelmutanten mit *npl3Δ* erfolgte auf Vollmediumagarplatten für 3 Tage bei 32°C (○).

Um auszuschließen, dass der auftretende Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* die Ursache für die genetischen Interaktionen ist, wurden zusätzlich die Exportmutanten *nmd3-2*, *mtr2-33* und *xpo1-1* mit *fun12Δ* gekreuzt und das Wachstum der Doppelmutanten auf FOA-Agarplatten analysiert. Im Vergleich zur synthetischen Letalität von

npl3Δ fun12Δ zeigen die Doppelmutanten *fun12Δ nmd3-2*, *fun12Δ mtr2-33* und *fun12Δ xpo1-1* ein zu der Einzelmutterante *fun12Δ* vergleichbares Wachstum (Abb. 29). Da der Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* somit nicht die Ursache für die genetische Interaktion von *NPL3* mit *LSG1*, *RPL10* und *FUN12* sein kann, wurde der Effekt einer Überexpression von *NPL3* in Mutanten von *LSG1*, *RPL10* und *FUN12* auf die Fähigkeit die auftretenden Wachstumsdefekte zu supprimieren, untersucht. Allerdings ist eine ausgewogene Menge von Npl3p für ein optimales Wachstum von Hefezellen notwendig, da die Deletion oder eine Überexpression von *NPL3* toxisch ist (Flach *et al.*, 1994; Hacker und Krebber, 2004) (Abb. 12 und Abb. 30). Daher führt die Überexpression von *NPL3* in Wildtyp im Vergleich zu einem Leervektor zu einem verringerten Wachstum. Einen Wachstumsdefekt weisen ebenso die beiden *lsg1*-Mutanten, *lsg1-2* und *lsg1-3*, auf (Abb. 30). Im Gegensatz dazu zeigen die Wachstumsanalysen von *rpl10(G161D)* und *fun12Δ*, dass durch die Überexpression von *NPL3* das Wachstum dieser Hefestämme gefördert wird. Im Gegensatz zur *NPL3*-Überexpression hat eine Überexpression von *MTR2* bzw. *NMD3* keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten beider Mutanten (Abb. 30).

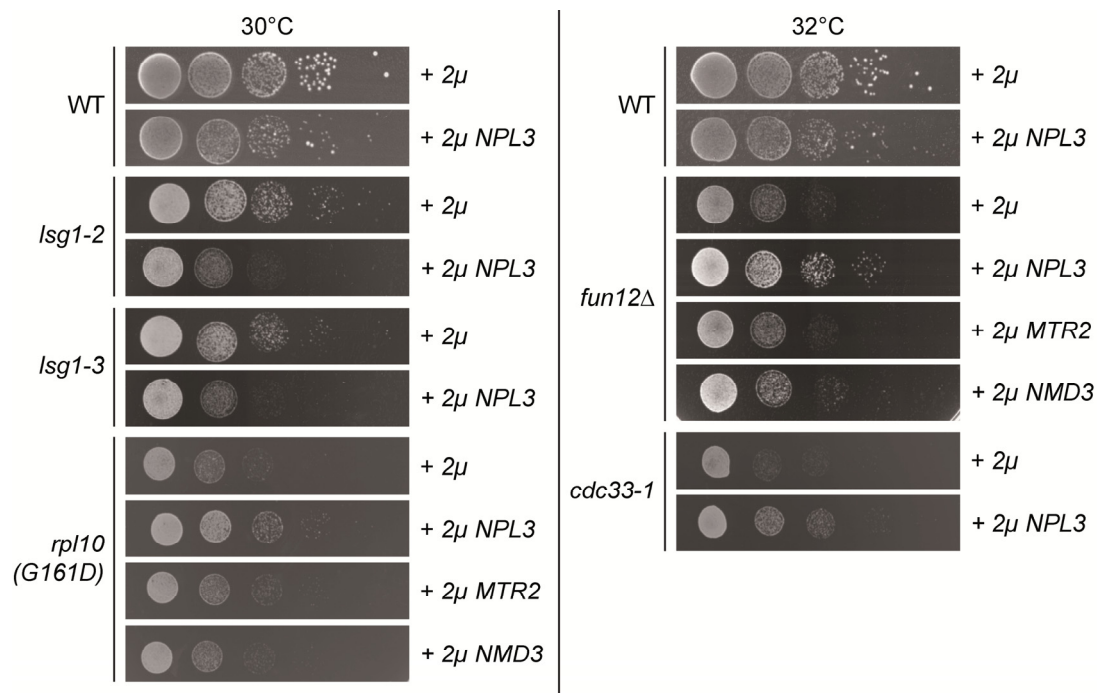


Abbildung 30: Eine Überexpression von *NPL3* supprimiert die Wachstumsdefekte der beiden *Subunit Joining* Mutanten *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* sowie der Translationsinitiationsmutante *cdc33-1*, wohingegen die Überexpression von *MTR2* bzw. *NMD3* keinen Einfluss auf das Wachstum von *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* besitzt.

Das Wachstum von Wildtyp, *lsg1-2*, *lsg1-3*, *rpl10(G161D)*, *fun12Δ* und *cdc33-1* wurde in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) oder eines *NPL3*-überexprimierenden Plasmides bzw. von *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* zusätzlich mit einem *MTR2*- bzw. *NMD3*-überexprimierenden Plasmid nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 30°C bzw. 30°C auf Selektionsagarplatten analysiert.

Es wurde bereits gezeigt, dass ASF/SF2, das humane Homolog von Npl3p, durch eine erhöhte Phosphorylierung des eIF4B-bindenden Proteins 4E-BP1 stimulierend auf die Translationsinitiation wirkt (Michlewski *et al.*, 2008). Daher wurde zusätzlich der Effekt der Überexpression von *NPL3* in der eIF4B-Mutante, *cdc33-1*, auf den temperaturabhängigen Wachstumsdefekt untersucht. Ähnlich den Beobachtungen von *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* fördert die Überexpression von *NPL3* das Wachstum von *cdc33-1* im Vergleich zum Leervektor (Abb. 29).

Die spezifische Suppression der Wachstumsdefekte sowohl in den *Subunit Joining* Mutanten *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* als auch in der Translationsinitiationsmutante *cdc33-1* spricht eher für eine Beteiligung von Npl3p an der Translationsinitiation als bei der zytoplasmatischen Prozessierung der prä-60S-Untereinheit. Dessen ungeachtet, wurde zusätzlich die ordnungsgemäße zytoplasmatische Rekrutierung von Rpl10p an die prä-60S-Untereinheit mit Hilfe einer Ko-IP von Rpl25p-myc mit Rpl10p-GFP in Wildtyp und *npl3Δ* nachgewiesen. Die Ko-IP in *npl3Δ* erfolgte mit einer Überexpression von *NMD3* bzw. *MTR2*, um einen zu Wildtyp vergleichbaren Export der prä-60S-Untereinheit zu gewährleisten (Abb. 26A). Die Menge des an Rpl25p-myc gebundenen Rpl10p-GFP in den Eluaten von *npl3Δ* ist ähnlich der von Wildtyp (Abb. 31). Dies zeigt, dass die Deletion von *NPL3* keinen Einfluss auf die Interaktion von Rpl25p mit Rpl10p besitzt und Npl3p daher nicht an diesem Prozessierungsschritt beteiligt ist.

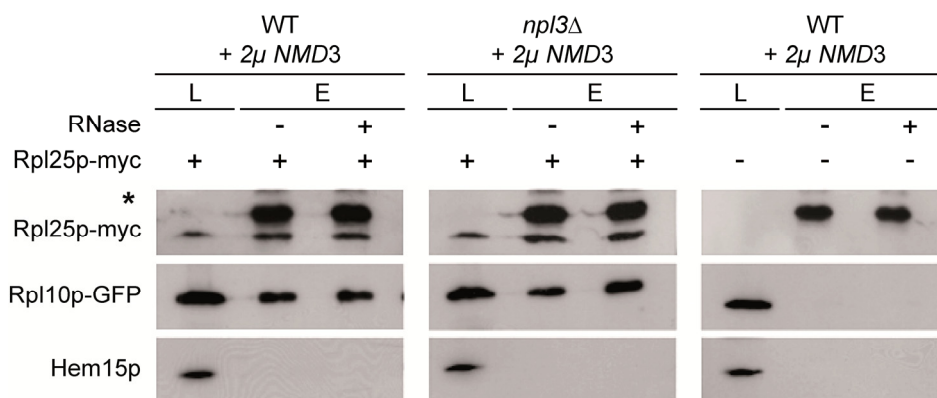


Abbildung 31: Die Deletion von *NPL3* hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung von Rpl10p an die prä-60S-Untereinheit.

Die im Zytoplasma stattfindende *in vivo* Interaktion von Rpl10p mit der prä-60S-Untereinheit wurde in Wildtyp (WT) und *npl3Δ* durch eine Ko-IP von Rpl25p-myc mit Hilfe eines myc-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot analysiert. Zur Gewährleistung des effizienten Exports der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* wurde die Ko-IP mit einer Überexpression von *NMD3* durchgeführt. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen myc, GFP bzw. Hem15p verwendet (L = Lysat, E = Eluat, * = Antikörperkette).

4.7 Die Deletion von *NPL3* führt zu Defekten im *Subunit Joining*

Da die bisherigen Ergebnisse auf eine Funktion von Npl3p während einer frühen Phase der Translation, dem *Subunit Joining*, hindeuten, wurde zunächst mit Hilfe einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation das Verhältnis bzw. die Zusammensetzung der ribosomalen Untereinheiten in *npl3Δ* analysiert. Die Zelllysate von Wildtyp und *npl3Δ* wurden auf lineare Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und die Mono- und Polysomen durch Ultrazentrifugation von den freien ribosomalen Untereinheiten separiert. Die Arretierung der sich in der Translation befindenden und mit mRNA's assoziierten Ribosomen erfolgte durch das Antibiotikum Cycloheximid. Während der Fraktionierung des Gradienten wurde die Absorption bei 254 nm gemessen, die die Verteilung der rRNA widerspiegelt und Aufschluss über das Verhältnis und die Zusammensetzung der ribosomalen Untereinheiten liefert. Ein Vergleich von Wildtyp und *npl3Δ* zeigt, dass die Deletion von *NPL3* sowohl zu einer reduzierten Anzahl an Monosomen (80S) führt (Abb. 32A und Abb. 32B) als auch zu einer erhöhten Menge an freien ribosomalen Untereinheiten (40S und 60S) (Abb. 32B).

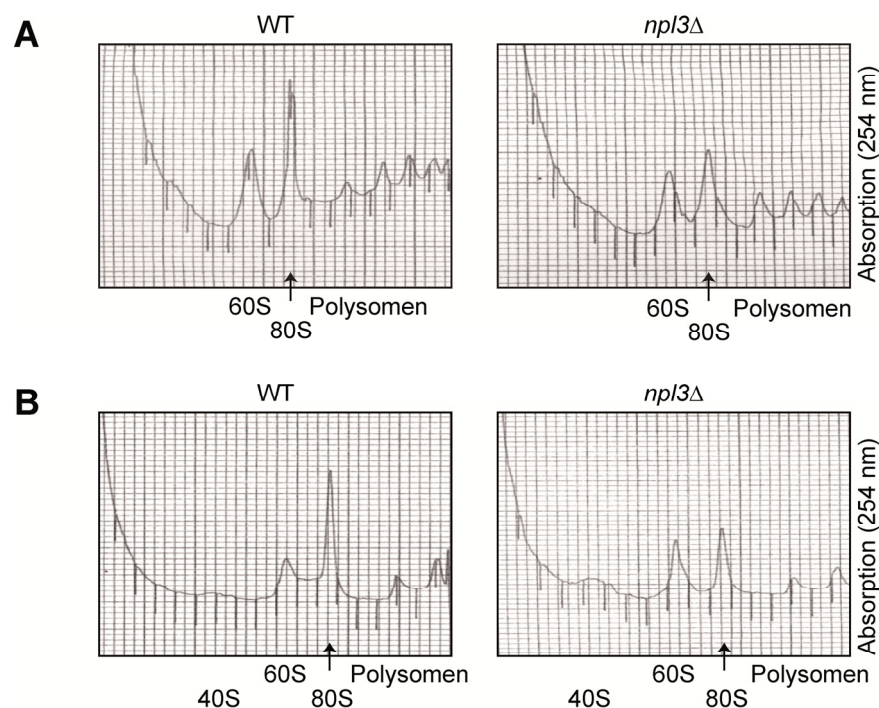


Abbildung 32: Die Deletion von *NPL3* führt zu einer reduzierten Monosomen- und Polysomenbildung. Für die Analyse der Ribosomenprofile bei 254 nm wurden Wildtyp (WT) und *npl3Δ* bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen und die Zelllysate anschließend mittels linearer Saccharose-Dichtegradienten (7-47%) analysiert. Die Zentrifugation der Saccharose-Dichtegradienten erfolgte bei 36.000 rpm für 6 h (A) bzw. 12 h (B). Die Positionen der 40S- und 60S-Untereinheit, des 80S-Ribosoms (Monosom) (Pfeil) sowie der Polysomen sind gekennzeichnet.

Des Weiteren ist aufgrund der verringerten Entstehung der Monosomen ebenso die Bildung der Polysomen in *npl3Δ* im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Darüber hinaus führt eine Überexpression von *MTR2* oder *NMD3* im Vergleich zu einem Leervektor zu keiner Veränderung des Ribosomenprofils in *npl3Δ* (Daten nicht gezeigt).

Neben den 80S-Ribosomen, die an der mRNA gebunden sind und sich in der Translation befinden, kann zusätzlich eine translationell inaktive Form der 80S-Monosomen gebildet werden, die so genannten *80S-Couples* (Kaempfer, 1969; Falvey und Staehelin, 1970a; Falvey und Staehelin, 1970b). Diese *80S-Couples* sind nicht mit mRNA's assoziiert und bestehen somit ausschließlich aus der 40S- und 60S-Untereinheit. *80S-Couples* werden in einigen Translationsmutanten, wie *fun12Δ*, vermehrt gebildet (Choi *et al.*, 1998; Pestova *et al.*, 2000). Eine Inkubation der Zelllysate mit hohen Salzkonzentrationen (0,5 M NaCl) bewirkt eine Dissoziation der *80S-Couples* in die beiden ribosomalen Untereinheiten, wohingegen mRNA-assozierte 80S-Ribosomen resistent gegenüber dieser Behandlung sind. Zur Analyse des Effektes einer Hochsalzbehandlung auf das Ribosomenprofil von *npl3Δ* wurden Saccharose-Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt. Eine Deletion von *NPL3* zeigt unter Hochsalzbedingungen im Vergleich zu einer physiologischen Salzkonzentration keine Veränderung der ribosomalen Zusammensetzung und weist somit keine signifikante Ausbildung von *80S-Couples* auf (Daten nicht gezeigt).

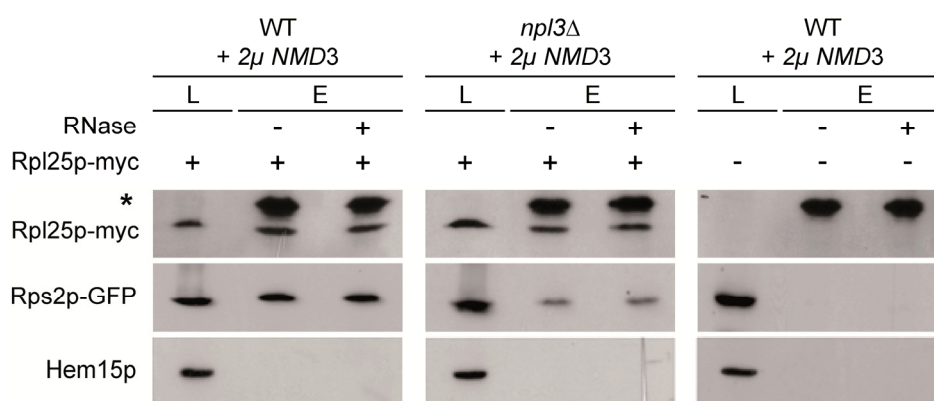


Abbildung 33: Die Deletion von *NPL3* führt zu einer verminderten Bildung des Monosoms.

Die im Zytoplasma stattfindende *in vivo* Interaktion von Rps2p mit Rpl25p wurde in Wildtyp (WT) und *npl3Δ* durch eine Ko-IP von Rpl25p-myc mit Hilfe eines myc-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot analysiert. Zur Gewährleistung des effizienten Exports der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* wurde die Ko-IP mit einer Überexpression von *NMD3* durchgeführt. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen myc, GFP bzw. Hem15p verwendet (L = Lysat, E = Eluat, * = Antikörperlacke).

Die verminderte Bildung der Monosomen in *npl3Δ* wurde zusätzlich mit einer Ko-IP von einem spezifischen Protein der 60S-Untereinheit, Rpl25p-myc, mit einem spezifischen Protein der 40S-Untereinheit, Rps2p-GFP, analysiert, da beide Proteine ausschließlich bei der Ausbildung des 80S-Ribosoms assoziieren. Diese Ko-IP wurde mit einer Überex-

pression von *NMD3* oder *MTR2* durchgeführt, um den Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* zu supprimieren und eine vergleichbare zytoplasmatische Menge beider ribosomaler Untereinheiten in Wildtyp und *npl3Δ* zu gewährleisten. In den Eluaten von *npl3Δ* ist die RNase-insensitive Interaktion von Rps2p-GFP mit Rpl25p-myc im Vergleich zum Wildtyp verringert (Abb. 33 und Daten nicht gezeigt). Der in *npl3Δ* auftretende Exportdefekt ist somit nicht die Ursache für die reduzierte Interaktion von der 40S- mit der 60S-Untereinheit.

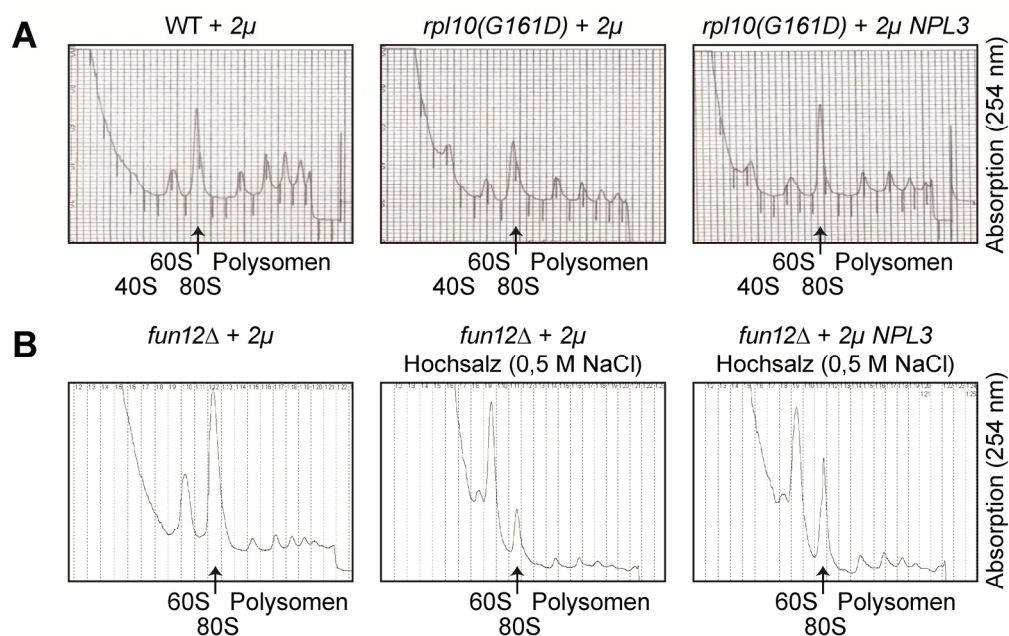


Abbildung 34: Die Überexpression von *NPL3* fördert die Bildung von Monosomen in den *Subunit Joining* Mutanten *rpl10(G161D)* und *fun12Δ*.

Für die Analyse der Ribosomenprofile bei 254 nm wurden Wildtyp (WT) in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) sowie *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) bzw. eines *NPL3*-überexprimierenden Plasmides bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen und die Lysate anschließend mittels linearer Saccharose-Dichtegradienten (7-47%) analysiert. Die *fun12Δ*-Zelllysate wurden zum Teil unter hohen Salzkonzentrationen aufgeschlossen (0,5 M NaCl). Die Zentrifugation der Saccharose-Dichtegradienten erfolgte für 6 h bei 36.000 rpm. Die Positionen der 40S- und 60S-Untereinheit, des 80S-Ribosoms (Monosom) (Pfeil) sowie der Polysomen sind gekennzeichnet.

Zum Nachweis eines möglichen aktiven Einfluss von Npl3p auf das *Subunit Joining* wurde das Ribosomenprofil von den *Subunit Joining* Mutanten *rpl10(G161D)* und *fun12Δ*, in denen die Überexpression von *NPL3* die Wachstumsdefekte supprimiert, analysiert. Durch eine Überexpression von *NPL3* wird die Bildung des Monosoms (80S) in beiden Mutanten im Vergleich zum Leervektor verstärkt (Abb. 34 und Daten nicht gezeigt). Da *fun12Δ* im Gegensatz zu *rpl10(G161D)* vermehrt 80S-Couples ausbildet, könnte die verstärkte Monosomenbildung nach Überexpression von *NPL3* entweder aus einer erhöhten Menge an 80S-Couples oder aus mRNA-gebundenen Monosomen resultieren. Zur Überprüfung dieser Möglichkeiten wurde das Ribosomenprofil von *fun12Δ* mit einer Überexpression

von *NPL3* ebenso in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen durchgeführt. Da in *fun12Δ* die *80S-Couples* einen Großteil der 80-Ribosomen ausbilden, dissoziieren diese, wie erwartet, nach Hochsalzbehandlung in die ribosomalen Untereinheiten (Abb. 33). Diese gravierende Reduktion des Monosomenanteils ist nicht im Wildtyp zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Obwohl unter den Hochsalzbedingungen eine Dissoziation der *80S-Couples* erfolgt, ist durch die Überexpression von *NPL3* in *fun12Δ* im Vergleich zu einem Leervektor der Anteil der mRNA-gebundenen Monosomen (80S) erhöht. Demzufolge wird durch die Überexpression von *NPL3* die Bildung von *80S-Couples* in *fun12Δ* nicht signifikant gefördert.

4.8 Npl3p unterstützt den Prozess des *Subunit Joinings* durch Homodimerisierung

Die vorhergehenden Ergebnisse deuten auf eine neue Funktion von Npl3p in einer frühen Phase der Translationsinitiation, dem *Subunit Joining*, hin, bei dem die 60S-Untereinheit mit der mRNA-gebundenen 40S-Untereinheit assoziiert. Allerdings ist unklar, wie Npl3p bei diesem Prozess eine unterstützende Funktion aufweisen könnte. Da Npl3p zum einen mRNP's und zum anderen die prä-60S-Untereinheiten in das Zytoplasma transportiert, könnte Npl3p über Homodimerisierung die Assoziation beider RNP's fördern. Dies könnte stabilisierend auf die Bildung der Monosomen wirken und somit eine schnelle, effiziente Translation gewährleisten. Es wurde bereits *in vivo* mit Hilfe von Ko-IP's gezeigt, dass Npl3p mit sich selbst assoziiert und daher die Fähigkeit besitzt, Homodimere auszubilden (Yu *et al.*, 2004; McBride *et al.*, 2005). Jedoch ist unklar, ob diese Homodimerisierung von Npl3p direkt erfolgt oder zusätzliche Ko-Faktoren beteiligt sind.

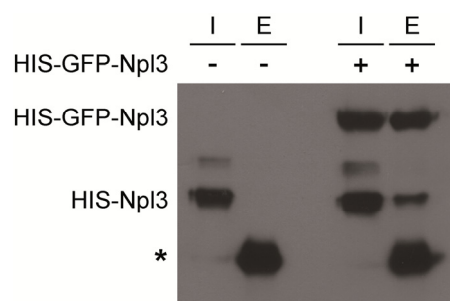


Abbildung 35: Npl3 bildet *in vitro* Homodimere.

Die *in vitro* Interaktion von rekombinant exprimiertem, aus Bakterien aufgereinigtem HIS-GFP-Npl3 mit HIS-Npl3 wurde durch eine Ko-IP von HIS-GFP-Npl3 mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot analysiert. Für die Detektion der Proteine wurde ein HIS-spezifischer Antikörper verwendet (I = Input, E = Eluat, * = Antikörperkette).

Zur Überprüfung dessen wurde eine *in vitro* Ko-IP von rekombinant exprimiertem HIS-myc-Npl3 bzw. HIS-GFP-Npl3 zusammen mit HIS-Npl3 durchgeführt. Die in den Ko-IP's verwendeten Proteine wurden in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen rekombinant exprimiert und über Ni-NTA Agarose mit Hilfe des HIS-Anhanges aufgereinigt. In den Ko-IP's wurde eine direkte Interaktion von HIS-myc-Npl3 bzw. HIS-GFP-Npl3 mit HIS-Npl3 und somit dessen Homodimerisierung *in vitro* nachgewiesen (Abb. 35 und Daten nicht gezeigt).

Die zu einem gewissen Prozentsatz stattfindende Ko-Sedimentierung von Npl3p mit Mono- und Polysomen zeigt, dass Npl3p während der Translationsinitiation mit dem mRNP assoziiert ist (Windgassen *et al.*, 2004). Daher wurde die physikalische Interaktion von Npl3p mit einem spezifischen Protein der 40S-Untereinheit, Rps2p, durch eine Ko-IP analysiert. Die Interaktion müsste spezifisch beim Prozess des *Scannings*, bei dem die 40S-Untereinheit das Start-Kodon der mRNA sucht, sowie bei der Monosomenbildung erfolgen. Durch eine RNase-Behandlung der Lysate wurde die mRNA-abhängige Interaktion, die ausschließlich beim *Scanning* erfolgt, aufgehoben und somit alleinig die bei der Monosomenbildung auftretende Wechselwirkung analysiert. Die Ko-IP zeigt in Wildtyp eine RNase-insensitive Interaktion von Rps2p-GFP mit myc-Npl3p (Abb. 36). Im Gegensatz dazu ist diese Interaktion in der *Subunit Joining* Mutante *rpl10(G161D)*, in der eine reduzierte Monosomenbildung nachgewiesen wurde, verringert. Hingegen ist die Interaktion des ribosomalen Proteins der 60S-Untereinheit, rpl10(G161D)p-GFP in der Mutante bzw. Rpl10p-GFP in Wildtyp, mit myc-Npl3p untereinander vergleichbar. Demzufolge bleibt die Assoziation von Npl3p mit der 60S-Untereinheit in *rpl10(G161D)* unverändert, wohingegen die Interaktion mit der 40S-Untereinheit reduziert ist.

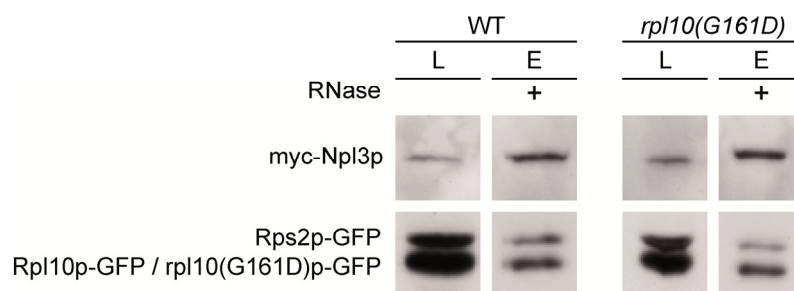


Abbildung 36: Ein Defekt im *Subunit Joining* führt aufgrund der verringerten Monosomenbildung zur reduzierten Interaktion von Npl3p mit der 40S-Untereinheit, jedoch nicht mit der 60S-Untereinheit. Die *in vivo* Interaktion von Rps2p und Rpl10p bzw. rpl10(G161D)p mit Npl3p wurde in Wildtyp und der *Subunit Joining* Mutante *rpl10(G161D)* durch eine Ko-IP von myc-Npl3p mit Hilfe eines myc-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot analysiert. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen myc bzw. GFP verwendet (L = Lysat, E = Eluat).

Die Homodimerisierungsdomäne von Npl3p wurde mit Hilfe einer 2-Hybrid-Analyse charakterisiert, in der die Interaktionsfähigkeit verschiedener Proteinfragmente von Npl3p mit Npl3p untersucht wurde (Daten von Claudia Baierlein, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung). Aufgrund der Ergebnisse wurde die Homodimerisierungsdomäne von Npl3p im Carboxyterminus lokalisiert (Abb. 37A). Durch eine schrittweise Verkürzung des Carboxyterminus um jeweils 25 Aminosäuren wurde die Binderegion, die für die Interaktion ausreichend ist, auf die essentiellen Aminosäuren 267-339 eingeschränkt. Allerdings sind für eine vollständige Homodimerisierung von Npl3p die Aminosäuren 267-364 notwendig (Abb. 37A). Zusätzlich zu den 2-Hybrid-Analysen wurde durch Ko-IP's nachgewiesen, dass die Expression der carboxyterminalen Domäne für eine *in vivo* Homodimerisierung ausreichend ist (Daten von Claudia Baierlein, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung).

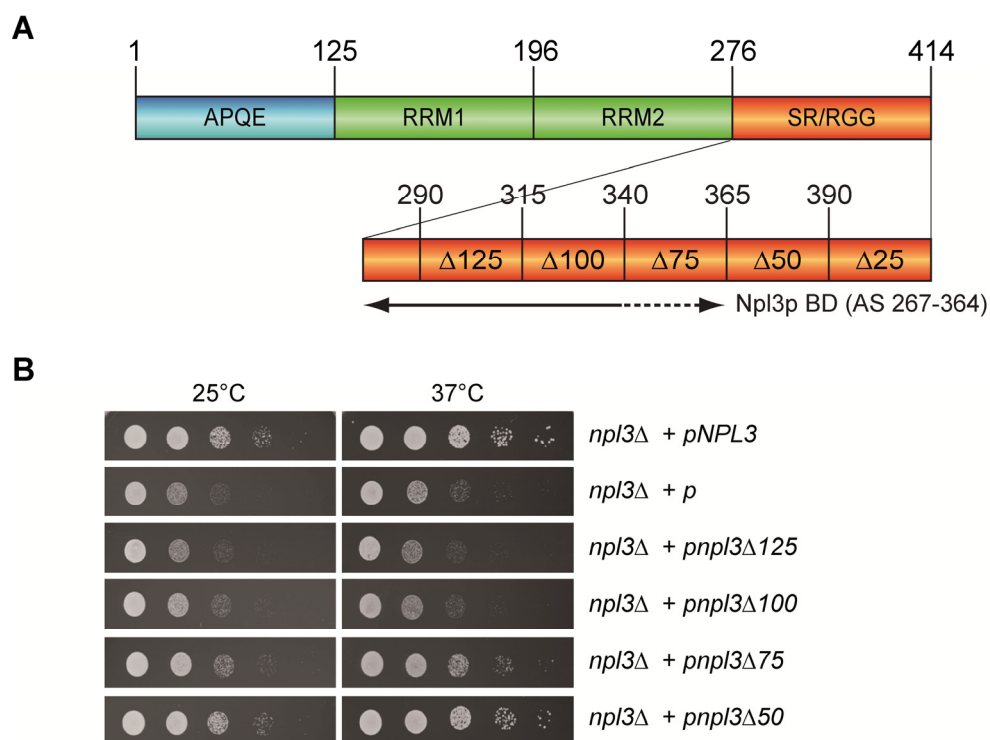


Abbildung 37: Die Homodimerisierung von Npl3p ist essentiell für die Suppression des Wachstumsdefektes in *npl3Δ*.

(A) Die Domänenstruktur von Npl3p mit der aminoterminalen APQE-Domäne, den beiden RRM's sowie der für die Homodimerisierung und die Interaktion mit dem Importrezeptor Mtr10p notwendigen carboxyterminalen SR-Domäne sind schematisch dargestellt. Die minimale Region für die Homodimerisierung ist mit einer durchgezogenen Linie dargestellt. Die gestrichelte Linie symbolisiert die Region, die für eine vollständige Homodimerisierung notwendig ist (AS = Aminosäure). (B) Das Wachstum von *npl3Δ* im *BY*-Stammb Hintergrund in Anwesenheit eines Leervektors (*p*), eines *NPL3*-exprimierenden Plasmides, sowie mit Plasmiden, welche die carboxyterminal verkürzten Versionen von *NPL3* exprimierten, wurde nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 25°C analysiert.

Zur Analyse, ob die Homodimerisierung von Npl3p für ein optimales Wachstum notwendig ist, wurden die carboxyterminal verkürzten Versionen von *NPL3* auf die Fähigkeit untersucht, den Wachstumsdefekt von *npl3Δ* im *BY*-Stammhintergrund zu supprimieren. Die Wachstumsanalyse der Deletionsmutanten von *NPL3* zeigt, dass nur die homodimerisierungsfähigen Mutanten *npl3Δ50* und *npl3Δ75* das Wachstum von *npl3Δ* fördern (Abb. 37B). Es ist jedoch anzumerken, dass das Wachstum von *npl3Δ75* im Vergleich zum Wildtyp und *npl3Δ50* leicht reduziert ist, da vermutlich die Npl3p-Homodimerisierung nicht vollständig stattfindet. Im Gegensatz dazu bleibt das Wachstum von *npl3Δ* nach der Expression der carboxyterminalen Verkürzungen *npl3Δ100* und *npl3Δ125* im Vergleich zu einem Leervektor unverändert.

Da die Homodimerisierung essentiell für die Funktionalität von Npl3p ist, wurde deren etwaiger Effekt auf die Translation analysiert. Diesbezüglich wurde *npl3Δ* bei einer Expression der carboxyterminal verkürzten Varianten von *NPL3* mit radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Methionin inkubiert und die durch Translation synthetisierten Proteine audioradio-graphisch detektiert (Abb. 37). Die carboxyterminal verkürzten Varianten *npl3Δ50* und *npl3Δ75* supprimieren nicht nur den Wachstumsdefekt von *npl3Δ*, sondern erhöhen ebenso die Translationsrate ähnlich zum Wildtyp. Im Vergleich dazu weist *npl3Δ* bei Expression von *npl3Δ100* einen zu *npl3Δ* mit einem Leervektor (*p*) vergleichbaren Translationsdefekt auf (Abb. 38).

WT		<i>prt1-1</i>		<i>npl3Δ</i>						°C
+ <i>p</i>		+ <i>p</i>		+ <i>p</i>	+ <i>pnpl3</i>	+ <i>pnpl3</i>	+ <i>pnpl3</i>			
					Δ100	Δ75	Δ50			
25	37	25	37	25	37	25	37	25	37	min
10		10		10		10		10		

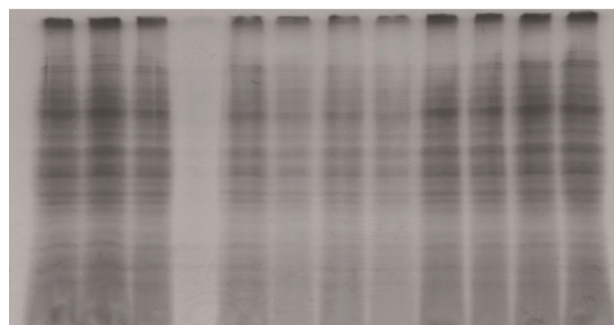


Abbildung 38: Die Homodimerisierung von Npl3p ist essentiell für die Suppression der Translationsdefekte in *npl3Δ*.

Für die Analyse der *de novo* Proteinbiosynthese wurden Wildtyp (WT) und die Translationsinitiationsmutante *prt1-1* in Anwesenheit eines Leervektors (*p*) sowie von *npl3Δ* im *BY*-Stammhintergrund in Anwesenheit eines Leervektors (*p*) bzw. eines Plasmides, welches jeweils eine carboxyterminal verkürzte Version von *NPL3* exprimiert, in Methionin-freiem Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, anschließend geteilt und entweder bei 25°C oder für 10 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Methionin wurde dessen Einbau in die synthetisierten Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE autoradiographisch analysiert.

In den carboxyterminalen Deletionsmutanten von *NPL3* bleiben die beiden RRM's erhalten. Sollte nach Expression dieser Mutanten die verkürzten Proteine noch mRNA binden, könnte die Funktionalität beim mRNA-Export aufgrund des fehlenden Carboxyterminus beeinträchtigt werden. Somit könnte durch die Assoziation der verkürzten Npl3p-Versionen der Transport der mRNP's blockiert und aufgrund dessen die Translation inhibiert werden. Zum Ausschluss des durch einen mRNA-Exportdefekt hervorgerufenen, sekundären Translationsdefektes wurde die Lokalisation der mRNA mittels einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit Hilfe einer Cy3-gekoppelten oligo-dT₍₅₀₎ Sonde in den *npl3*-Deletionsmutanten untersucht. Das Ergebnis zeigt sowohl bei 25°C als auch nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C in Wildtyp und in den *npl3*-Deletionsmutanten eine Gleichverteilung der mRNA im Zytoplasma und im Zellkern (Abb. 39). Im Gegensatz dazu ist in *rat7-1* eine Akkumulation der mRNA im Zellkern als Folge der mRNA-Exportdefekte ersichtlich. Die Deletion der carboxyterminalen Domäne von *NPL3* hat somit keinen Einfluss auf den mRNA-Export. Allerdings zeigen Ko-IP's der 60S- und 40-Untereinheit in den Deletionsmutanten *npl3Δ100* und *npl3Δ125*, dass die fehlende Homodimerisierung von Npl3p das *Subunit Joining* vermindert (Daten von Claudia Baierlein, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung).

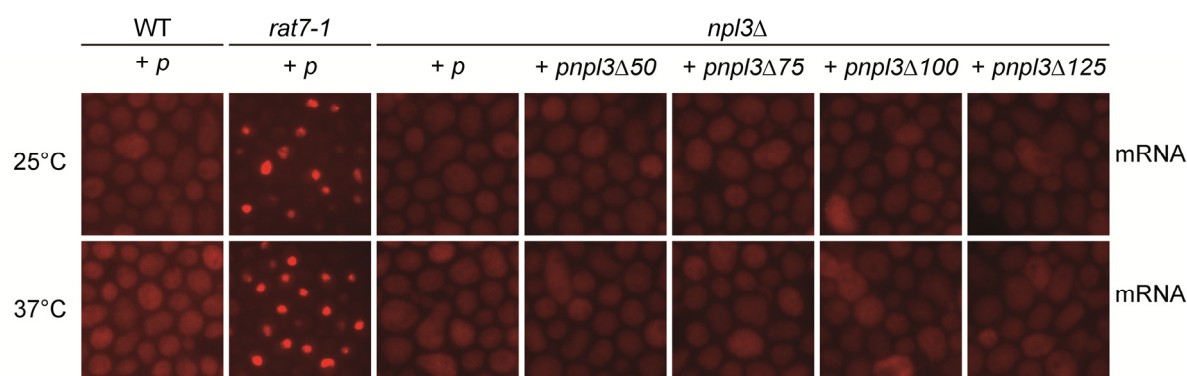


Abbildung 39: Die carboxyterminalen Deletionen von *NPL3* führen im *S. cerevisiae* *BY*-Stammhintergrund nicht zu mRNA-Exportdefekten.

Die Lokalisation der mRNA wurde in Wildtyp (WT) und in *rat7-1* in Anwesenheit eines Leervektors (*p*) sowie in *npl3Δ* in Anwesenheit eines Leervektors (*p*) bzw. eines Plasmides, welches jeweils eine carboxyterminal verkürzte Version von *NPL3* exprimierte im *BY*-Stammhintergrund analysiert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, anschließend geteilt und entweder bei 25°C oder für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die polyadenylierten mRNA's mittels einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durch eine Cy3-gekoppelte oligo-dT₍₅₀₎ Sonde detektiert.

Zur weiteren Charakterisierung der Funktionalität der Npl3p-Homodimerisierung wurden die verkürzten Versionen von *NPL3* zusätzlich im essentiellen *S288C*-Stammhintergrund analysiert. Da die Deletion von *NPL3* in diesem Stammhintergrund letal ist, enthielt *npl3Δ* neben den Plasmiden, die eine Expression der verkürzten *NPL3*-Versionen ermöglichen und eine *LEU2*-Resistenz besitzen, ein *NPL3*-exprimierendes Plasmid mit einer

URA3-Resistenz durchgeführt. Zunächst wurde eine Wachstumsanalyse der *npl3*-Deletionsmutanten erfolgte bei 25°C und 37°C auf FOA-Agarplatten durchgeführt, die selektiv das Wachstum der Hefezellen ermöglichen, die das *NPL3*-exprimierende Plasmid mit einer *URA3*-Resistenz verloren haben und ausschließlich die verkürzten *NPL3*-Versionen exprimieren. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Zellanzahl wurde das Wachstum der Hefestämme zusätzlich auf -LEU-Agarplatten analysiert.

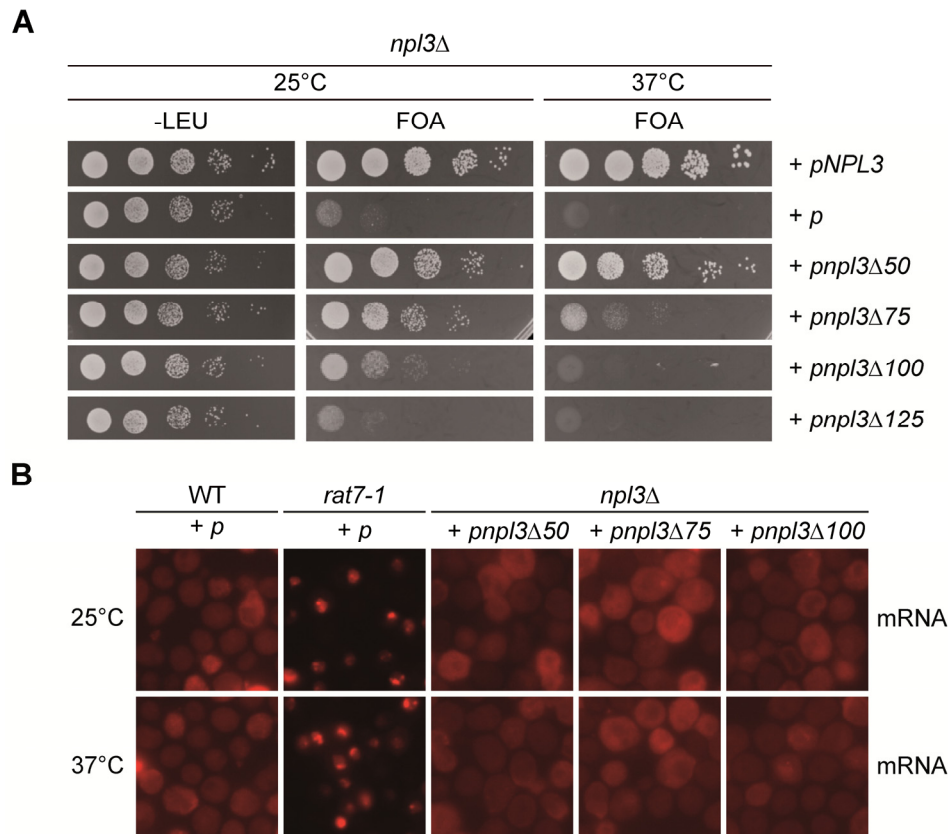


Abbildung 40: Die Deletion der Homodimerisierungsdomäne von *NPL3* führt im *S. cerevisiae* S288C-Stammhintergrund zu starken Wachstumsdefekten bzw. zur Letalität, jedoch nicht zu mRNA-Exportdefekten.

(A) Das Wachstum von *npl3Δ* in Anwesenheit eines Leervektors (*p*), eines *NPL3*-exprimierenden Plasmides, bzw. eines Plasmides, das jeweils eine carboxyterminal verkürzte Version von *NPL3* exprimierte, im S288C-Stammhintergrund wurde nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 25°C bzw. 37°C auf FOA-Agarplatten analysiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Zellanzahl wurde das Wachstum der Hefestämme nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 25°C auf -LEU-Agarplatten analysiert. (B) Die Lokalisation der mRNA wurde in Wildtyp (WT) und in *rat7-1* in Anwesenheit eines Leervektors (*p*) sowie in *npl3Δ* in Anwesenheit eines Plasmides, das jeweils eine carboxyterminal verkürzte Version von *NPL3* exprimierte im S288C-Stammhintergrund analysiert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, anschließend geteilt und entweder bei 25°C oder für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die polyadenylierten mRNA's mittels einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durch eine Cy3-gekoppelte oligo-dT₍₅₀₎ Sonde detektiert.

Ähnlich den Ergebnissen von *npl3Δ* im BY-Stammhintergrund zeigt die homodimerisierungsfähige *NPL3*-Deletion, *npl3Δ50*, ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum (Abb. 40A). Außerdem weist die eingeschränkt homodimerisierungsfähige *npl3*-Mutante, *npl3Δ75*, eine im Vergleich zu *npl3Δ50* und Wildtyp leicht reduzierte Wachstumsrate auf,

die sich durch eine Inkubation bei 37°C weiter verringert. Die Deletion von *NPL3* um 125 Aminosäuren (*npl3Δ125*) führt ähnlich zu *npl3Δ* mit einem Leervektor (*p*) zur Letalität, wohingegen *npl3Δ100* bei 25°C eingeschränkt wachstumsfähig ist. Allerdings zeigt diese homodimerisierungsunfähige *NPL3*-Mutante (*npl3Δ100*) bei 25°C ein im Vergleich zu *npl3Δ75* reduziertes Wachstum und ist bei 37°C letal.

Zur Analyse, ob diese reduzierten Wachstumsraten von *npl3Δ75* und *npl3Δ100* durch mRNA-Exportdefekte hervorgerufen werden, wurde die Lokalisation der mRNA in den lebensfähigen *npl3*-Deletionsmutanten mittels einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung untersucht. Die Analyse der mRNA-Lokalisation in *npl3Δ* mit einer Expression der verkürzten *NPL3*-Versionen *npl3Δ50*, *npl3Δ75* und *npl3Δ100* im *S288C*-Stammhintergrund zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine gleichmäßige Verteilung der mRNA im Zytoplasma und im Zellkern (Abb. 40B). Im Gegensatz dazu akkumuliert die mRNA in *rat7-1* als Folge der mRNA-Exportdefekte im Zellkern. Diese Ergebnisse sind ähnlich denen im zuvor untersuchten *BY*-Stammhintergrund.

4.9 Die Überexpression der carboxyterminalen Domäne von *NPL3* führt zu dominant-negativen Effekten

Zur weiteren Charakterisierung der Homodimerisierungsfunktion von Npl3p wurden die Auswirkungen einer möglichen Inhibierung der Homodimerisierung bei Überexpression der carboxyterminalen Domäne analysiert. Bei der Expression dieser Domäne (*npl3-C*) kann das Proteinfragment aufgrund des Fehlens der RRM's keine RNA binden, ist jedoch noch homodimerisierungsfähig, da der Carboxyterminus von Npl3p für die Assoziation mit Npl3p ausreichend ist. Die carboxyterminale Variante von Npl3p, *npl3p-C*, bindet ebenso an die carboxyterminale Domäne von Npl3p und besetzt dadurch die Bindestellen für eine mögliche Homodimerisierung. Daher sollte durch die Überexpression von *npl3-C* die Monosomenbildung gestört sein. Die daraus resultierende reduzierte Homodimerisierungseffizienz von Npl3p wurde mit Hilfe einer Ko-IP *in vivo* gezeigt (Daten von Claudia Baierlein, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung).

Zunächst wurden die Lokalisationen der mit GFP-gekoppelten carboxyterminalen (GFP-*npl3p-C*) und der als Kontrolle verwendeten aminoterminalen Domäne (GFP-*npl3p-N*) von Npl3p analysiert. Die beiden Konstrukte wurden von einem *CEN*- bzw. einem *2μ*-Plasmid unter der Kontrolle des starken, konstitutiven Promotors der Alkohol--Dehydrogenase (ADH) exprimiert. Da ein *2μ*-Plasmid im Vergleich zu einem

CEN-Plasmid in hoher Kopienzahl in den Hefezellen vorliegt, erfolgt somit eine zusätzliche Steigerung der Expression. Dies konnte mit Hilfe von Western Blot Analysen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

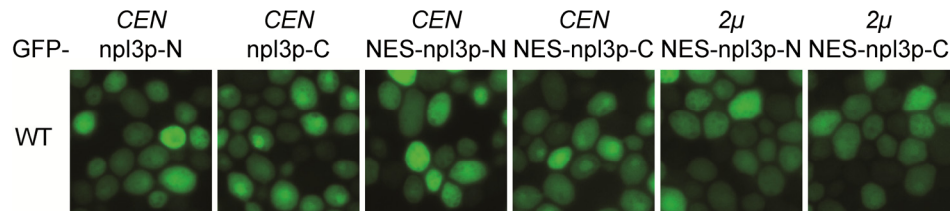


Abbildung 41: Lokalisation der carboxy- und aminoterminalen Versionen von Npl3p.

Die Lokalisation der GFP-gekoppelten Versionen der carboxy- bzw. aminoterminalen Domäne von Npl3p mit oder ohne nukleäres Exportsignal (NES) in Wildtyp (WT) wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie bei 25°C analysiert. Die Expression der verschiedenen Versionen erfolgte von einem *CEN*- oder *2μ*-Plasmid.

Im Gegensatz zu dem im Zytoplasma und Zellkern gleichverteilten GFP-npl3p-N zeigt die Lokalisationsanalyse von GFP-npl3p-C eine nukleäre Anreicherung (Abb. 41). Die vorwiegend nukleäre Lokalisation erfolgt durch den bevorzugten Transport von GFP-npl3p-C in den Zellkern, da sich im Carboxyterminus ebenso die Bindestelle für den Importrezeptor Mtr10p befindet. Da der Prozess des *Subunit Joinings* im Zytoplasma stattfindet, wurde zusätzlich eine Version der carboxy- und der aminoterminalen Domäne hergestellt, an die ein nukleäres Exportsignal (NES) gekoppelt wurde. Durch diese Signalsequenz erfolgt im Gegensatz zu GFP-npl3p-C eine gleichmäßige Verteilung des Fusionsproteins (GFP-NES-npl3p-C) im Zytoplasma und im Zellkern, da der Import des carboxyterminalen Domäne in den Zellkern durch die erhöhte Exportrate in das Zytoplasma kompensiert wird (Abb. 41).

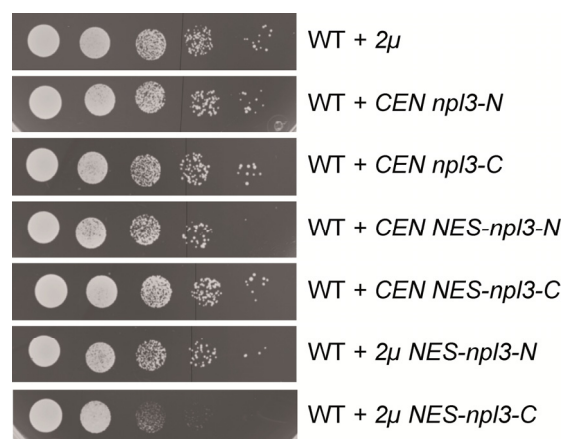


Abbildung 42: Die Überexpression der carboxyterminalen Domäne von *NPL3* mit *NES* führt zur Inhibierung des Wachstums von Wildtyp.

Das Wachstum von Wildtyp (WT) im *BY*-Stammhintergrund in Anwesenheit eines Leervektors (*2μ*) bzw. Plasmiden, welche die carboxy- oder aminoterminalen Versionen von *NPL3* überexprimierten, wurde nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 39°C analysiert.

Nach der Lokalisationsanalyse der carboxy- bzw. aminoterminalen Npl3p-Varianten wurde der Effekt einer Überexpression der carboxyterminalen Homodimerisierungsdomäne auf das Wachstum von Wildtyp analysiert. Durch die Überexpression von *NES-npl3-C* erfolgt im Vergleich zum Leervektor (2μ) allerdings erst bei einer Inkubationstemperatur von 39°C eine schwache Reduzierung des Wachstums von Wildtyp (Abb. 42). Im Gegensatz dazu führt die Überexpression der aminoterminalen Domäne von *NPL3* mit (*NES-npl3-N*) oder ohne *NES* (*npl3-N*) zu keiner Wachstumsbeeinträchtigung. Zusätzlich ist anzumerken, dass das Wachstum von Wildtyp mit einer Überexpression der überwiegend nukleär lokalisierten carboxyterminalen Domäne ohne *NES* (*npl3-C*) unbeeinflusst ist.

Zur Analyse, ob das Wachstum aufgrund eines mRNA-Exportdefekts verlangsamt ist, wurde eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Wildtyp mit einer Überexpression von entweder der carboxy- oder der aminoterminalen Domäne von *NPL3* mit einem *NES* durchgeführt. Diese zeigt ähnlich dem Wildtyp mit einem Leervektor (2μ) eine Gleichverteilung der mRNA im Zytoplasma und im Zellkern im Gegensatz zu *rat7-1*, in der eine nukleäre Akkumulation der mRNA als Folge der mRNA-Exportdefekte zu beobachten ist (Abb. 43). Aufgrund der unveränderten mRNA-Lokalisation entstehen durch eine Überexpression der verschiedenen *NPL3*-Konstrukte demzufolge keine mRNA-Exportdefekte.

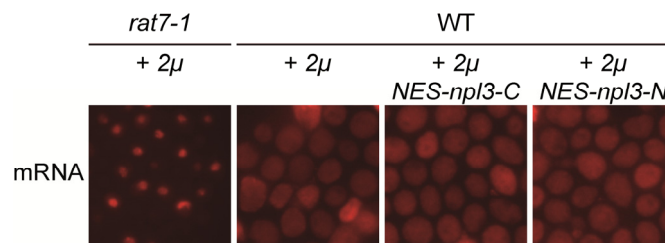


Abbildung 43: Die Überexpression der carboxyterminalen Domäne von *NPL3* mit *NES* führt nicht zu mRNA-Exportdefekten.

Die Lokalisation der mRNA wurde in Wildtyp (WT) und in *rat7-1* in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) sowie in WT in Anwesenheit eines Plasmides, welches jeweils die carboxy- bzw. aminoterminal Domäne von *NPL3* mit einem *NES* überexprimierte im *BY*-Stammhintergrund analysiert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, anschließend für 30 min bei 39°C inkubiert. Danach wurden die polyadenylierten mRNA's mittels einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durch eine Cy3-gekoppelte oligo-dT₍₅₀₎ Sonde detektiert.

Da ein mRNA-Exportdefekt nicht die Ursache für das durch Überexpression von *NES-npl3-C* hervorgerufene verringerte Wachstum von Wildtyp ist, wurde die Translationsrate und -effizienz analysiert. Zur Überprüfung dessen wurden die Hefezellen nach einer Inkubation für 30 min bei 39°C mit radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Methionin inkubiert und die durch Translation synthetisierten Proteine autoradiographisch detektiert. Das Ergebnis zeigt, dass durch die Überexpression von *NES-npl3-C* die Translationsrate in Wildtyp verringert ist, wohingegen diese durch die Überexpression von *NES-npl3-N* unbe-

einflusst bleibt (Abb. 44). Die durch Überexpression der carboxyterminalen Domäne von *NPL3* mit einem *NES* reduzierte Homodimerisierung von Npl3p könnte demnach zu einer Inhibierung des *Subunit Joinings* führen, welche die dominant-negativen Effekte auf die Translationsrate und das Wachstum von Wildtyp erklären würde (Abb. 42 und Abb. 44).

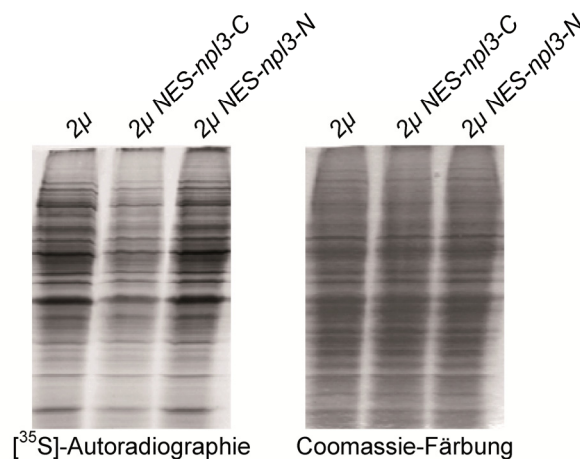


Abbildung 44: Die Überexpression der carboxyterminalen Domäne von *NPL3* mit *NES* führt zu Translationsdefekten.

Für die Analyse der *de novo* Proteinbiosynthese wurde Wildtyp (WT) in Anwesenheit eines Leervektors (2µ) bzw. eines Plasmides, welches jeweils die carboxy- bzw. aminoterminal Domäne von *NPL3* mit einem *NES* überexprimierte, in Methionin-freiem Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen und anschließend für 30 min bei 39°C inkubiert. Durch die Zugabe von radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Methionin wurde dessen Einbau in die synthetisierten Proteine mit Hilfe einer SDS-PAGE autoradiographisch analysiert (links) und die gleichmäßige Beladung durch Coomassie-Färbung des Geles kontrolliert (rechts).

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden Saccharose-Dichtegradientenzentrifugationen in Wildtyp mit einer Überexpression der carboxyterminale Domäne von *NPL3* durchgeführt. Dazu wurden die Zelllysate von Wildtyp mit einer Überexpression von *NES-npl3-C* bzw. *NES-npl3-N* auf lineare Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und die Mono- und Polysomen durch Ultrazentrifugation von den freien ribosomalen Untereinheiten separiert. Im Gegensatz zu einer Überexpression von *NES-npl3-N* wird die Menge an Monosomen (80S) in Wildtyp durch eine Überexpression von *NES-npl3-C* reduziert, so dass diese ebenso den Prozess des *Subunit Joinings* inhibiert (Abb. 45A).

Zusätzlich wurde der Defekt im *Subunit Joining* mit Hilfe einer Ko-IP von Rpl25p-myc mit Rps3p in Wildtyp mit und ohne einer Überexpression von *NES-npl3-C* analysiert. Die Assoziation beider Proteine erfolgt ausschließlich bei Bildung des Monosoms. Diese Ko-IP zeigt in Wildtyp mit einer Überexpression der carboxyterminalen Domäne von *NPL3* mit *NES* eine reduzierte Interaktion von Rpl25p mit Rps3p (Abb 45B). Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression der aminoterminalen Domäne von *NPL3*, *NES-npl3-N*, zu keiner Änderung der Interaktion von Rpl25p mit Rps3p (Daten nicht gezeigt) und hat somit

keinen Einfluss auf das *Subunit Joining*. Der auftretende Homodimerisierungsdefekt von Npl3p in Wildtyp mit einer Überexpression von *NES-npl3-C* verursacht daher eine verringerte Verknüpfung der 40S- und 60S-Untereinheit. Dieser dominant-negative Effekt auf das *Subunit Joining* unterstützt daher das Modell, in dem die Homodimerisierung von Npl3p für die effiziente Translationsinitiation benötigt wird.

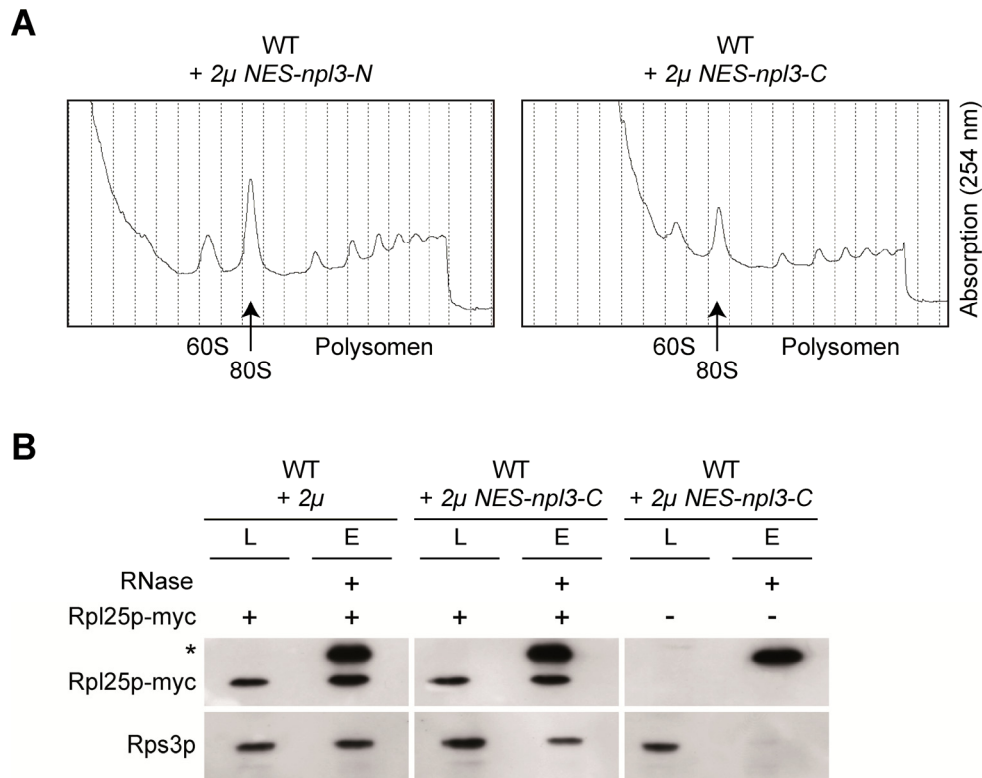


Abbildung 45: Die Überexpression der carboxyterminalen Domäne von *NPL3* mit *NES* führt zur verminderten Monosomenbildung.

(A) Für die Analyse der Ribosomenprofile bei 254 nm wurde Wildtyp (WT) in Anwesenheit eines Plasmides, welches jeweils die carboxy- bzw. aminoterminal Domäne von *NPL3* mit einem *NES* überexprimierte, bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, für 30 min bei 39°C inkubiert und die Lysate anschließend mittels linearer Saccharose-Dichtegradienten (7-47%) analysiert. Die Zentrifugation der Saccharose-Dichtegradienten erfolgte für 6 h bei 36.000 rpm. Die Positionen der 60S-Untereinheit, des 80S-Ribosoms (Monosom) (Pfeil) sowie der Polysomen sind gekennzeichnet. (B) Die im Zytoplasma stattfindende *in vivo* Interaktion von Rps3p mit Rpl25p wurde in Wildtyp (WT) in Anwesenheit eines Leervektors (2 μ) bzw. eines Plasmides, welches die carboxyterminale Domäne von *NPL3* mit einem *NES* überexprimiert durch eine Ko-IP von Rpl25p-myc mit Hilfe eines myc-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot analysiert. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen myc und Rps3p verwendet (L = Lysat, E = Eluat, * = Antikörperkette).

4.10 Dbp5p hat eine Funktion bei der Translation

Die DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p, ebenso Rat8p genannt, besitzt wichtige Funktionen beim Transport der mRNA in das Zytoplasma. Obwohl es an der Zellkernmembran angereichert vorliegt, ist der Großteil des Proteins im Zytoplasma lokalisiert (Tseng *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde mit Hilfe von Saccharose-Dichtegradientenzentrifugationen gezeigt, dass Dbp5p zu einem ähnlich hohen Prozentsatz wie das poly(A)-Bindepotein Pab1p mit Polysomen assoziiert (Daten von Merle Windgassen; Gross *et al.*, 2007). Die Lokalisation des Proteins sowie dessen Ko-Sedimentation mit Polysomen weist auf eine mögliche Funktion bei der Translation hin. Allerdings sind die potentiellen, zytoplasmatischen Funktionen von Dbp5p noch unklar. Aufgrund der zentralen Funktion von Dbp5p beim mRNA-Export weisen temperatursensitive Mutanten von *DBP5*, wie *rat8-1*, *rat8-2*, *rat8-3* und *rat8-7*, eine starke Misslokalisierung der mRNA bei 37°C auf (Snay-Hodge *et al.*, 1998).

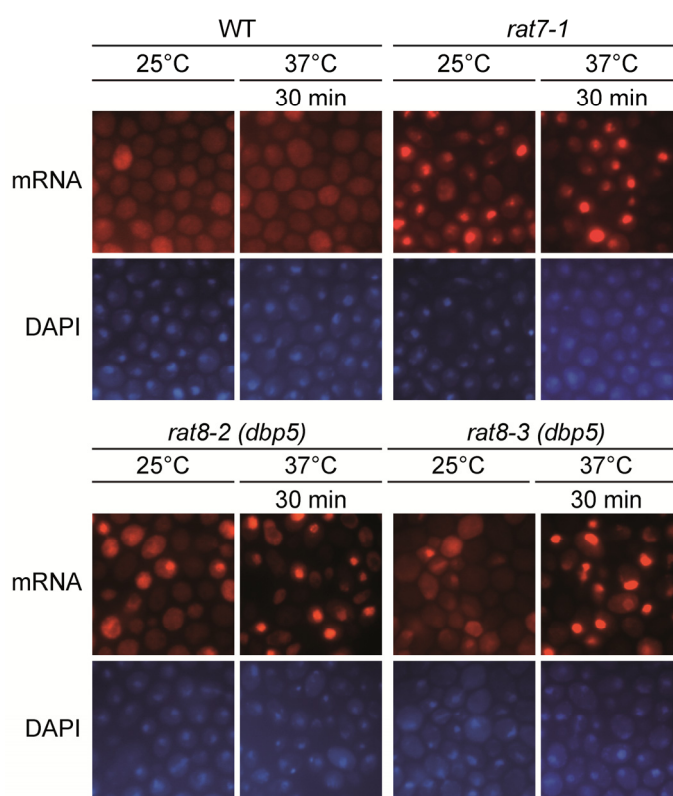


Abbildung 46: Die beiden *dbp5*-Mutanten *rat8-2* und *rat8-3* weisen bei 25°C geringe mRNA-Exportdefekte im Vergleich zu 37°C auf.

Die Lokalisation der mRNA wurde in Wildtyp (WT), der mRNA-Export defizienten Nukleoporinmutante *rat7-1* sowie den beiden *dbp5*-Mutanten *rat8-2* und *rat8-3* analysiert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, anschließend geteilt und bei 25°C bzw. für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die polyadenylierten mRNA's mittels einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durch eine Cy3-gekoppelte oligo-dT₍₅₀₎ Sonde detektiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt.

Die Analyse der mRNA-Lokalisation in *rat8-2* und *rat8-3* bei 25°C zeigt, dass die auftretenden mRNA-Exportdefekte im Vergleich zu 37°C und im Gegensatz zu *rat8-1* und *rat8-7* milder sind (Abb. 46 und Daten nicht gezeigt). Die Positivkontrolle *rat7-1* weist sowohl bei 25°C als auch bei 37°C eine starke Akkumulation der mRNA im Zellkern als Folge der mRNA-Exportdefekte auf. Da ein blockierter Transport der mRNA zwangsläufig zu sekundären Translationsdefekten führt, wurden für die nachfolgenden Experimente die beiden Mutanten *rat8-2* und *rat8-3* aufgrund des im Vergleich zu *rat8-1* bzw. *rat8-7* bei 25°C geringeren mRNA-Exportdefektes verwendet.

Zur Aufklärung einer möglichen Funktion von Dbp5p während der Translation wurde zunächst der Effekt von Translationsinhibitoren auf das Wachstum von *dbp5*-Mutanten analysiert. Für die Wachstumsanalyse von *rat8-2* und *rat8-3* wurden Vollmediumagarplatten (YPD) in Anwesenheit der Antibiotika Paromomycin, Cycloheximid und Hygromycin B verwendet. Diese Antibiotika weisen in verschiedenen Schritten der Translation eine inhibitorische Wirkung auf. Durch Assoziation von Paromomycin mit der 18S rRNA der 40S-Untereinheit blockiert das Antibiotikum spezifisch die Bindung der aa-tRNA an die A-Position der 60S-Untereinheit. Im Gegensatz dazu hemmt Cycloheximid die Aktivität der Peptidyltransferase der 60S-Untereinheit, so dass der Transfer der aa-tRNA's inhibiert wird. Durch Hygromycin B hingegen erfolgt eine strukturelle Veränderung an der A-Position der 60S-Untereinheit, wodurch die Fehlerrate des Einbaus einer nicht korrekten aa-tRNA erhöht wird (*misreading*). Zusätzlich hemmt das Antibiotikum den Translokationsprozess des 80S-Ribosoms.

Die Wachstumsanalyse der *dbp5*-Mutanten, *rat8-2* und *rat8-3*, zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion des Wachstums in Anwesenheit der Antibiotika (Abb. 47). Da in den *dbp5*-Mutanten der Transport der mRNA beeinträchtigt ist, könnten die mRNA-Exportdefekte das reduzierte Wachstum hervorrufen. Daher wurde zusätzlich das Wachstum der Nukleoporinmutante *rat7-1* untersucht, die bereits bei 25°C im Vergleich zu *rat8-2* und *rat8-3* starke mRNA-Exportdefekte aufweist (Abb. 46). Die Mutante *rat7-1* zeigt hingegen bei Anwesenheit der Translationsinhibitoren im Gegensatz zu den *dbp5*-Mutanten ein zu Wildtyp vergleichbares Wachstum (Abb. 47). Somit kann der mRNA-Export in *rat8-2* und *rat8-3* nicht die unmittelbare Ursache für die beobachteten Wachstumsdefekte darstellen.

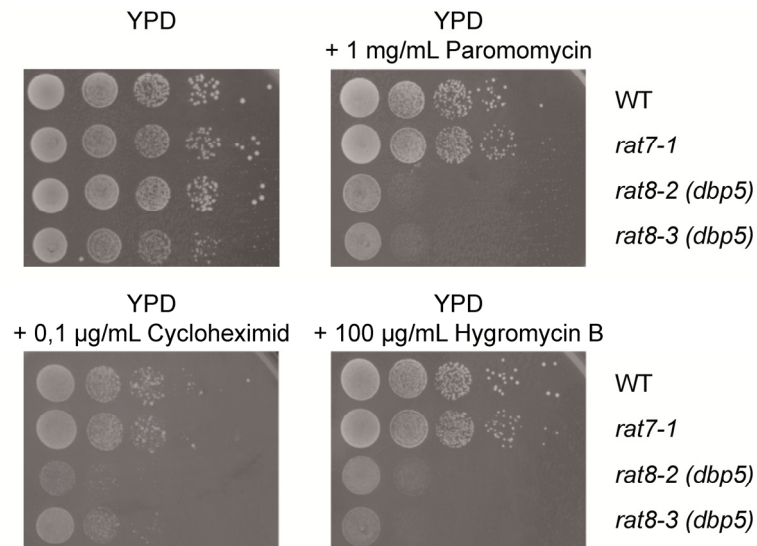


Abbildung 47: Das Wachstum der beiden *dbp5*-Mutanten *rat8-2* und *rat8-3* ist sensitiv gegenüber Translationsinhibitoren.

Das Wachstum von *S. cerevisiae* Wildtyp (WT), der mRNA-Export defizienten Nukleoporinmutante *rat7-1* sowie den beiden *dbp5*-Mutanten, *rat8-2* und *rat8-3*, wurde in seriellen Verdünnungen auf Vollmedium-agarplatten (YPD) in Anwesenheit der Translationsinhibitoren Paromomycin, Cycloheximid und Hygromycin B nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 25°C analysiert.

4.10.1 Dbp5p hat eine Funktion bei der Translationstermination

Um einen Anhaltspunkt zu finden, in welcher Phase der Translation Dbp5p eine Funktion besitzt, wurde eine Suppressionsanalyse in temperatursensitiven Translationsmutanten durchgeführt. Somit wurde untersucht, ob die Überexpression von *DBP5* das Wachstum dieser Mutanten bei nicht-permissiven Temperaturen verbessert. Die 24 für die Suppressionsanalyse verwendeten unterschiedlichen Hefestämme besitzen spezifische Mutationen in Proteinen, die eine Funktion in verschiedenen Phasen der Translation aufweisen (Tab. 20). Die Überexpression von *DBP5* wurde zum einen durch die Verwendung eines 2μ -Plasmides erreicht, da dieses im Vergleich zu einem *CEN*-Plasmid (1-2 Kopien pro Zelle) in hoher Kopienanzahl (20-80 Kopien pro Zelle) in den Hefezellen vorliegt. Zum anderen wurde eine im Vergleich zum 2μ -Plasmid stärkere Überexpression durch den Austausch der Promotorregion von *DBP5* mit einem Galaktose-induzierbaren Promotor erzielt. Bei Verwendung des Galaktose-induzierbaren *DBP5*-Konstruktes wurde anstatt Glukose ausschließlich Galaktose als Kohlenhydratquelle für die Anzucht verwendet, da die Anwesenheit von Glukose zur Repression der *DBP5*-Expression führt. Die Wachstumsanalyse der Mutanten zeigt, dass die Überexpression von *DBP5* in *pab1-53*, *sup45-2* und *sup35-21* bei nicht-permissiven Temperaturen im Vergleich zum Leervektor zu einem positiven Wachstumseffekt führt (Tab. 20 und Abb. 48).

Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse der Wachstumsanalysen von den verwendeten Translationsmutanten mit einer Überexpression von *DBP5*.

Translations-phase	Protein	Gen(e) in <i>S. cerevisiae</i>	Mutanten in <i>S. cerevisiae</i>	Suppression des Wachstums durch <i>DBP5</i> -Überexpression
Initiation	eIF4A	<i>TIF1</i> & <i>TIF2</i>	<i>tif1-1 tif2Δ</i>	-
	eIF4B	<i>TIF3</i>	<i>tif3Δ</i>	-
	eIF4G	<i>TIF4631</i> & <i>TIF4632</i>	<i>tif4631Δ tif4632-1</i> <i>tif4631Δ tif4632-6</i> <i>tif4631Δ tif4632-8</i> <i>tif4631Δ tif4632-430</i> <i>tif4631Δ tif4632-N300</i> <i>tif4631Δ tif4632-459</i>	-
	eIF4E	<i>CDC33</i>	<i>cdc33-1</i>	-
	eIF3	<i>PRT1</i>	<i>prt1-1</i>	-
	Ded1	<i>DED1</i>	<i>ded1-21</i> <i>ded1-120</i> <i>ded1-199</i>	-
Elongation	eEF2	<i>TEF1</i> & <i>TEF2</i>	<i>tef1Δ tef2-2</i> <i>tef1Δ tef2-3</i> <i>tef1Δ tef2-4</i> <i>tef1Δ tef2-7</i> <i>tef1Δ tef2-9</i> <i>tef1Δ tef2-10</i> <i>tef1Δ tef2-13</i>	-
Termination	Pab1	<i>PAB1</i>	<i>pap1-16</i> <i>pab1-101</i> <i>pab1-53</i>	+
	eRF1	<i>SUP45</i>	<i>sup45-2</i>	+
	eRF3	<i>SUP35</i>	<i>sup35-21</i>	+

Diese Mutanten, in denen eine spezifische Suppression des temperatursensitiven Wachstumsdefektes erfolgt, weisen wichtige Funktionen bei der Translationstermination auf. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von *DBP5* in Mutanten der Translationsinitiationsfaktoren eIF4A, eIF4B, eIF4G und eIF3 zu keiner verbesserten Wachstumsrate (Tab. 20 und Abb. 49). Beispielsweise bleibt das Wachstum der Mutante der an der Translationsinitiation beteiligten Helikase eIF4A durch die Überexpression von *DBP5* im Vergleich zum Leervektor unverändert (Abb. 49A). Ebenso ist nach Überexpression von *DBP5* in *eEF2*-Mutanten, z.B. *tef1Δ tef2-9* und *tef1Δ tef2-10*, die Defekte in der Translationselongation aufweisen, keine Suppression der bei höheren Temperaturen auftretenden Wachstumsdefekte zu erkennen (Tab. 20 und Abb. 49B). Weitere Mutanten der in der Translationsinitiation involvierten DEAD-Box RNA-Helikase *DED1*, beispielsweise *ded1-199* und *ded1-120*, zeigen mit einer Überexpression von *DBP5* bei

nicht-permissiven Temperaturen kein verbessertes Wachstum im Vergleich zu einem Leervektor (Tab. 20 und Abb. 49C). Zusammenfassend zeigen die Suppressionsanalysen, dass das Wachstum von Mutanten der Translationsinitiations- und Translationselongationsfaktoren durch die Überexpression von *DBP5* unverändert ist, wohingegen Wachstumsdefekte von Mutanten der Translationsterminationsfaktoren supprimiert werden.

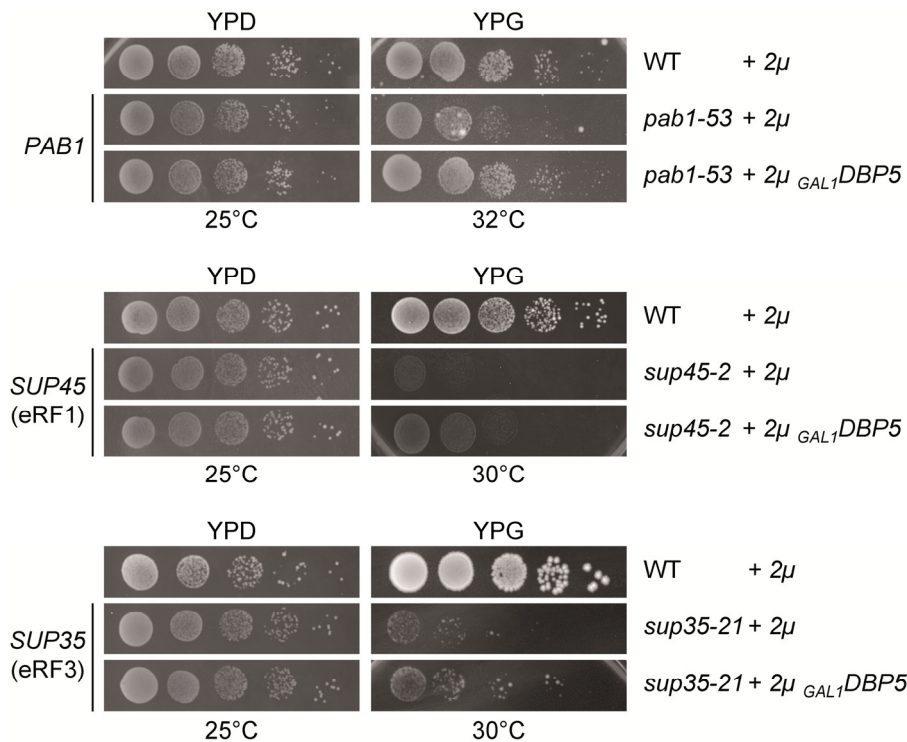


Abbildung 48: Eine Überexpression von *DBP5* supprimiert die Wachstumsdefekte der Translationsterminationsmutanten *pab1-53*, *sup45-2* und *sup35-21*.

Das Wachstum von Wildtyp (WT) in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) sowie in *pab1-53*, *sup45-2* und *sup35-21* in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) bzw. eines Plasmides, das *DBP5* überexprimierte (2μ *DBP5* bzw. 2μ *GAL1DBP5*), wurde nach einer Inkubation von 3-5 Tagen bei den angegebenen Temperaturen auf Vollmediumagarplatten mit Galaktose (YPG) analysiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Zellanzahl wurde das Wachstum der Hefestämme auf Vollmediumagarplatten mit Glukose (YPD) nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 25°C analysiert.

Die durch die spezifische Suppression der Wachstumsdefekte ermittelte genetische Interaktion von *DBP5* mit *PAB1* sowie mit beiden Terminationsfaktoren *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3) sollte durch Herstellung der Doppelmutanten und der darauf folgenden Wachstumsanalyse unterstützt werden. Durch Kreuzung der *dbp5*-Mutanten, *rat8-2* und *rat8-3*, mit *sup45-2*, *sup35-21* sowie den *pab1*-Mutanten, *pab1-16*, *pab1-53* und *pab1-101*, und anschließender Tetradendisektion wurden die Doppelmutanten in Anwesenheit eines *DBP5*-exprimierenden Plasmides mit einer *URA3*-Resistenz hergestellt. Im Anschluss wurde das Wachstum der Hefestämme in seriellen Verdünnungen auf FOA-Agarplatten analysiert, auf denen ausschließlich Hefezellen wachsen können, die *URA3* auxotroph sind

und somit das *DBP5*-exprimierende Plasmid verloren haben. Für die Wachstumskontrolle wurden die verwendeten Hefestämme parallel auf -URA-Agarplatten analysiert.

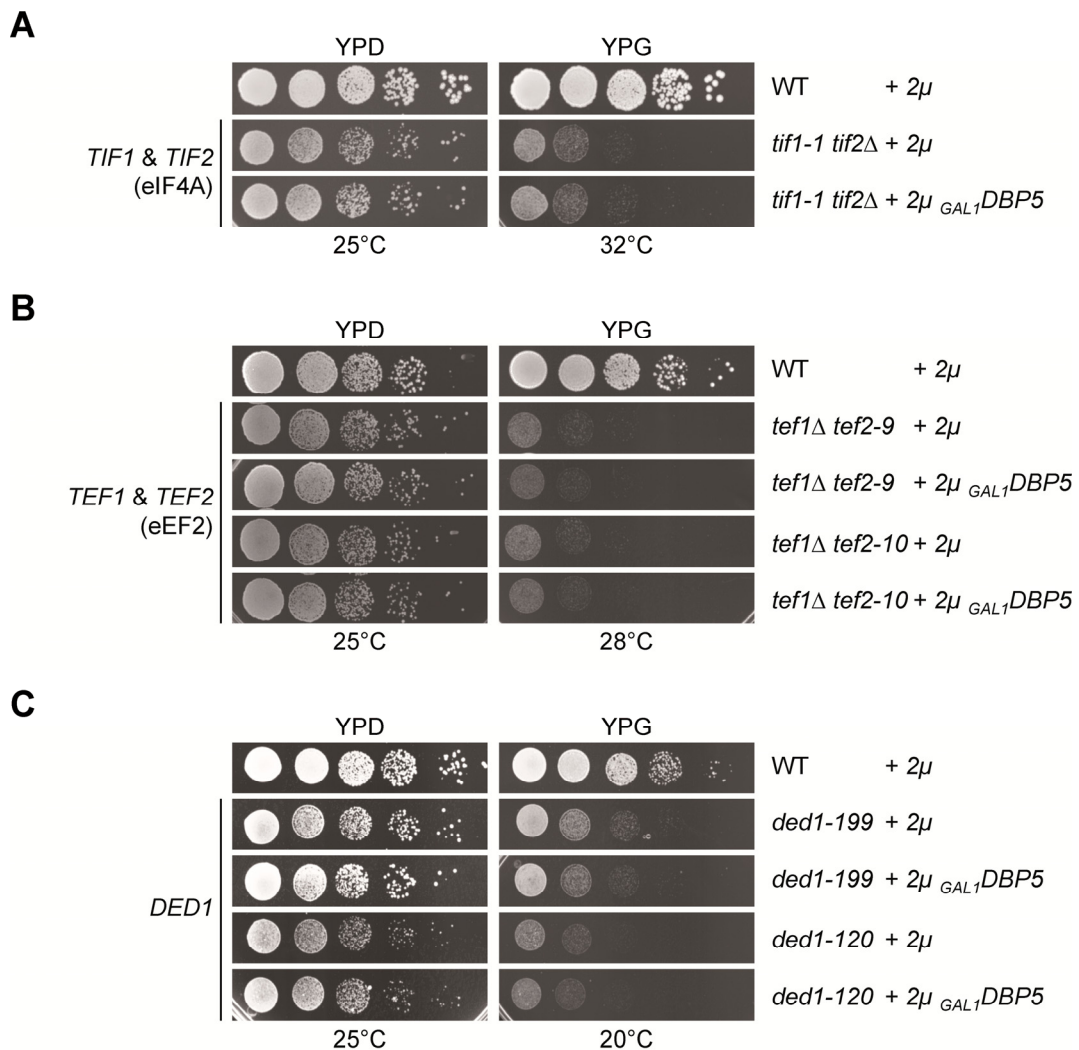


Abbildung 49: Eine Überexpression von *DBP5* supprimiert nicht die Wachstumsdefekte von Translationsinitiations- oder Translationselongationsmutanten.

Das Wachstum von Wildtyp (WT) in Anwesenheit eines Leervektors (2μ), der Translationsinitiationsmutante *tif1-1 tif2Δ*, den Translationselongationsmutanten *tef1Δ tef2-9* und *tef1Δ tef2-10* sowie den beiden Mutanten der in der Translationsinitiation involvierten DEAD-Box RNA-Helikase *DED1*, *ded1-199* und *ded1-120*, in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) bzw. eines Plasmides mit einer Überexpression von *DBP5* (2μ_{GAL1}*DBP5*) wurde nach einer Inkubation von 3-5 Tagen bei den angegebenen Temperaturen auf Vollmediumagarplatten mit Galaktose (YPG) analysiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Zellanzahl wurde das Wachstum der Hefestämme auf Vollmediumagarplatten mit Glukose (YPD) nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 25°C analysiert.

Die Einzelmутanten *rat8-2*, *rat8-3*, *sup45-2*, *sup35-21*, *pab-16*, *pab1-53* und *pab1-101* weisen ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum auf FOA-Agarplatten bei 25°C auf, wohingegen die Kombination einer *dbp5*-Mutation (*rat8-2* oder *rat8-3*) mit *sup45-2* zu einer synthetischen Letalität führt (Abb. 50). Die Doppelmutante *rat8-3 sup35-21* ist ebenfalls synthetisch letal und *rat8-2 sup35-21* weist ein stark eingeschränktes Wachstum im Gegensatz zu den Einzelmутanten auf. Eine synthetische Letalität tritt ebenfalls bei einer Kombination von *sup45-2* mit *sup35-21* auf, so dass dieser Effekt vergleichbar zu

dem von *rat8-2 sup45-2*, *rat8-3 sup45-2* sowie *rat8-3 sup35-21* ist. Starke Wachstumsdefekte zeigen die Doppelmutanten von *DBP5* (*rat8-2* bzw. *rat8-3*) mit *PAB1* (*pab1-16*, *pab1-53* bzw. *pab1-101*) im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmутanten (Abb. 50). Zusammenfassend bestätigen diese starken Wachstumsdefekte bzw. die synthetischen Letalitäten der *dbp5*-Doppelmutanten die in den Suppressionsanalysen ermittelten genetischen Interaktionen von *DBP5* mit *PAB1*, *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3).

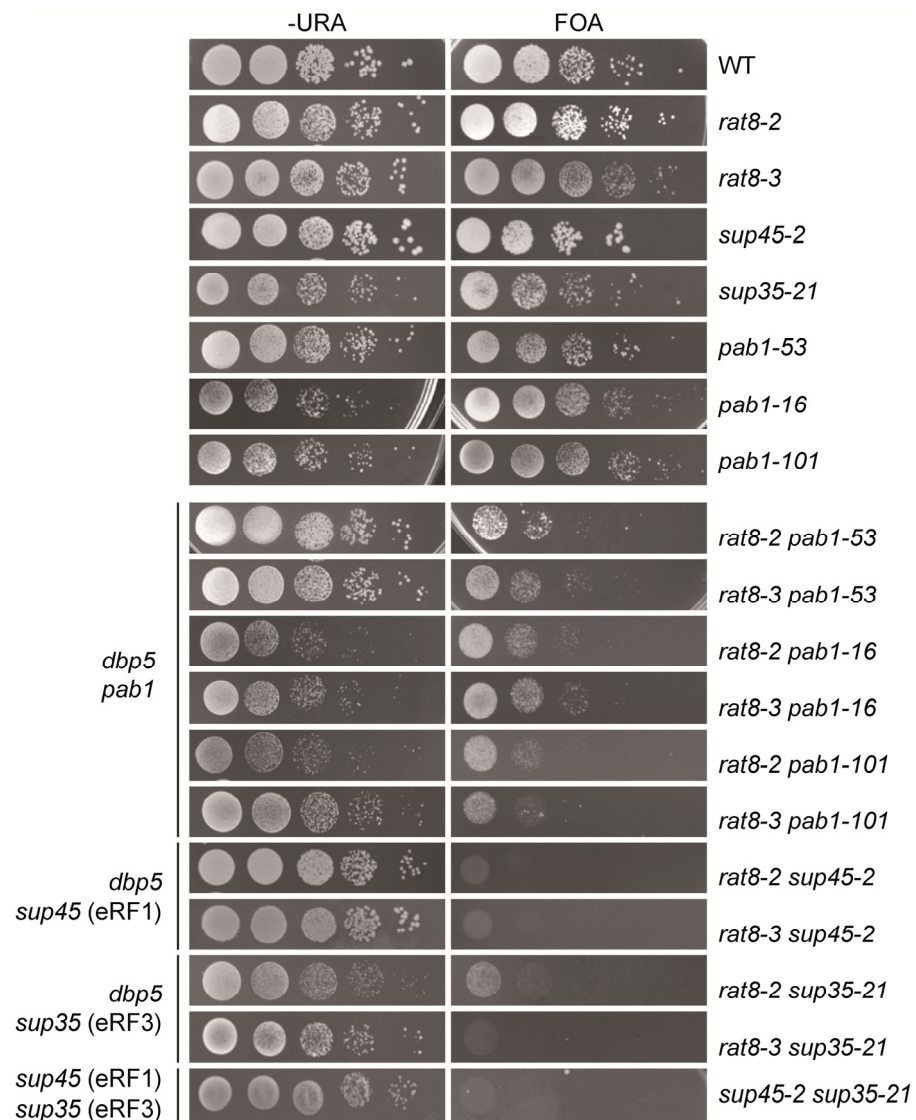


Abbildung 50: *DBP5* zeigt genetische Interaktionen mit *PAB1* und den Translationsterminationsfaktoren *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3).

Das Wachstum von Wildtyp (WT), den beiden *dbp5*-Mutanten, *rat8-2* und *rat8-3*, den beiden Translationsterminationsmutanten, *sup45-2* und *sup35-21*, und den *pab1*-Mutanten, *pab1-53*, *pab1-16* und *pab1-101*, wurde im Vergleich zu den *dbp5*-Doppelmutanten auf FOA-Agarplatten, die auf den Verlust des *DBP5*-exprimierenden Plasmides bzw. im Fall der eRF-Doppelmutante (*sup45-2 sup35-21*) auf den Verlust des *SUP45/SUP35*-exprimierenden Plasmides selektionieren, nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 25°C analysiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Zellanzahl wurde das Wachstum der Hefestämme nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 25°C auf -URA-Agarplatten analysiert.

Um auf eine spezifische genetische Interaktion von *DBP5* mit *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3) schließen zu können, wurde zusätzlich die genetische Interaktion von *DHH1* (DDX6; RCK/p54 in Säugern) mit den beiden Translationsterminationsfaktoren analysiert. Dhh1p, eine weitere DEAD-Box RNA-Helikase, ist im Gegensatz zu Dbp5p nicht essentiell und hat eine Funktion im NMD-Prozess (Tseng-Rogenski *et al.*, 2003; Collier und Parker, 2005). Durch Kreuzung von *dhh1Δ* mit *sup45-2* sowie *sup35-21* und anschließender Tetradisdissektion wurden die Doppelmutanten in Anwesenheit eines *SUP45/SUP35*-exprimierenden Plasmides mit einer *URA3*-Resistenz hergestellt. Im Anschluss wurde das Wachstum der Hefestämme in seriellen Verdünnungen auf FOA-Agarplatten analysiert, die auf den Verlust des *SUP45/SUP35*-exprimierenden Plasmides selektionieren. Das Ergebnis zeigt, dass die Doppelmutanten *dhh1Δ sup45-2* und *dhh1Δ sup35-21* bei 25°C ein zu den Einzelmutanten vergleichbares Wachstum auf FOA-Agarplatten aufweisen (Abb. 51).

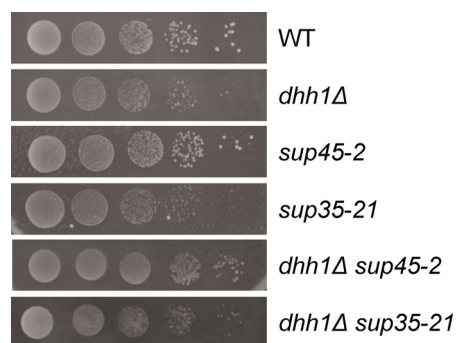


Abbildung 51: *DHH1* zeigt keine genetische Interaktionen mit den Translationsterminationsfaktoren *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3).

Das Wachstum von Wildtyp (WT), der Deletionsmutante der in NMD involvierten DEAD-Box RNA-Helikase *DHH1*, *dhh1Δ*, sowie den beiden Translationsterminationsmutanten, *sup45-2* und *sup35-21*, wurde im Vergleich zu den *dhh1Δ*-Doppelmutanten auf FOA-Agarplatten, die auf den Verlust des *SUP45/SUP35*-exprimierenden Plasmides selektionieren, nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 25°C analysiert.

4.10.2 Die katalytische Aktivität von Dbp5p wird bei der Translations-termination benötigt

Die genetischen Interaktionen von *DBP5* mit *SUP45* (eRF1), *SUP35* (eRF3) und *PAB1* weisen auf eine funktionelle Gemeinsamkeit der durch diese Gene kodierenden Proteine am Prozess der Translationstermination hin. In Eukaryonten wird die Termination über die beiden Translationsterminationsfaktoren Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) vermittelt (siehe Einleitung 1.8). Zusätzlich weist Pab1p eine regulatorische und über die direkte Interaktion mit Sup35p (eRF3) unterstützende Funktion in diesem Prozess auf (Cosson *et al.*, 2002). Die Erkennung und Bindung eines der drei in Eukaryonten existierenden

Stopp-Kodons UAA, UAG und UGA wird durch Sup45p (eRF1) gewährleistet, da für diese speziellen Kondons keine komplementären tRNA's existieren. Die Hydrolyse des synthetisierten Polypeptides von der tRNA wird durch ein hoch-konserviertes Aminosäure-Sequenzmotiv, einem Tripeptid bestehend aus Glyzin, Glyzin und Glutaminsäure (GGQ), von Sup45p (eRF1) mit Hilfe der GTPase Sup35p (eRF3) katalysiert (Frolova *et al.*, 1999; Inge-Vechtomov *et al.*, 2003). Hierfür assoziieren Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) über deren carboxyterminalen Regionen miteinander (Stansfield *et al.*, 1995b; Ito *et al.*, 1998). Für den Nachweis einer möglichen Funktion von Dbp5p bei der Translationstermination wurden duale Luziferasereporterversuche durchgeführt. Die dafür verwendeten Reporterkonstrukte bestehen aus einem hybriden ORF, der sich aus dem β -Galaktosidase exprimierenden *lacZ*-Gen und dem Luziferase exprimierenden *luc*-Gen zusammensetzt (Abb. 52). Die beiden ORF's sind durch variable Linkersequenzen, wie eine Haarnadelstruktur (*stem-loop*), einem Stopp-Kodon oder eines Leserahmen- bzw. einer Leserasterverschiebung um ein Nukleotid (+1 *frameshift*), miteinander verbunden. Eine Expression des *luc*-Genes erfolgte demnach nur nach Überlesen der Linkersequenz, so dass die Aktivität der Luziferase mit einem Kontrollkonstrukt, welches keine Linkersequenz zwischen den beiden Genen besitzt, ins Verhältnis gesetzt wurde. Da die Menge der mRNA's in den Hefestämmen, z.B. aufgrund von in den *dbp5*-Mutanten auftretenden mRNA-Exportdefekten, unterschiedlich ist, wurde diese mit Hilfe der konstitutiv exprimierten β -Galaktosidase angepasst, so dass die Luziferaseaktivitäten normalisiert werden konnten.

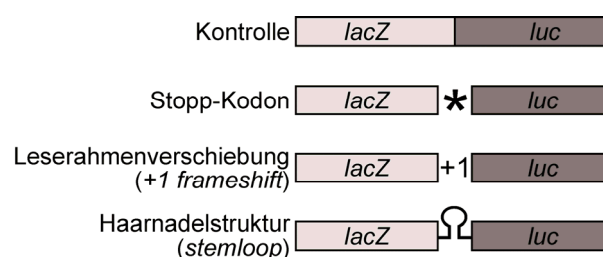


Abbildung 52: Schematische Darstellung der für die dualen Luziferasereporterversuche verwendeten Konstrukte.

Die durch das *lacZ*-Gen kodierte β -Galaktosidase wird zusammen mit der Luziferase, welche durch das *luc*-Gen kodiert wird, *in frame* exprimiert (Kontrolle). In den analysierten Konstrukten befindet sich zwischen den beiden ORF's eine variable Linkerregion, wie ein Stopp-Kodon, eine Leserahmenverschiebung oder eine Haarnadelstruktur, so dass die Translation der Luziferase ausschließlich nach Überlesen dieser Linkerregion erfolgt. Die durch die Expression des *lacZ*-Genes ermittelte Aktivität der β -Galaktosidase diente zur Normalisierung der mRNA-Menge.

Zunächst wurde die Luziferaseaktivität des Reporterkonstrukts mit dem Stopp-Kodon in der Linkerregion in Wildtyp und *dbp5*-Mutanten analysiert. Die Translation der Luziferase

dieses Reporterkonstruktes erfolgt ausschließlich, wenn der Terminationsprozess nicht eingeleitet und demzufolge das Stopp-Kodons überlesen wird. Im Allgemeinen wird durch die Anwesenheit des Stopp-Kodons die Luziferaseaktivität im Vergleich zum Kontrollkonstrukt erheblich reduziert (Abb. 53). Die Luziferaseaktivität des Kontrollkonstruktes wurde auf 100% festgelegt. Die Analyse des Reporterkonstruktes in den beiden *dbp5*-Mutanten zeigt, dass *rat8-2* eine Luziferaseaktivität von $22,5\% \pm 2,5\%$ und *rat8-3* eine Luziferaseaktivität von $24,5\% \pm 2,3\%$ im Gegensatz zum Wildtyp mit einer Luziferaseaktivität von $16,6\% \pm 1,5\%$ aufweist (Abb. 53 und Daten nicht gezeigt). Demzufolge ist bei Verwendung des Konstruktes mit dem Stopp-Kodon die absolute Luziferaseaktivität von *rat8-2* bzw. *rat8-3* verglichen zum Wildtyp um über 30% erhöht. Dies zeigt, dass mutiertes Dbp5p zu einer verminderten Erkennung des Stopp-Kodons führt. Zum Ausschluss eines unspezifischen Effektes der *dbp5*-Mutanten auf die erhöhten Translationsterminationsdefekte wurde *dhh1Δ* als Kontrolle in den dualen Luziferase-reporterversuchen verwendet. Die Analyse des Stopp-Kodon enthaltenen Konstruktes in *dhh1Δ* zeigt eine relative Luziferaseaktivität von $15,1\% \pm 1,5$ (Abb. 53). Daher ist in *dhh1Δ* im Unterschied zu den beiden *dbp5*-Mutanten die Erkennungsrate des Stopp-Kodons vergleichbar zu der des Wildtyps. Somit ist im Gegensatz zu Dhh1p die DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p erforderlich, um das Stopp-Kodon effizient zu erkennen.

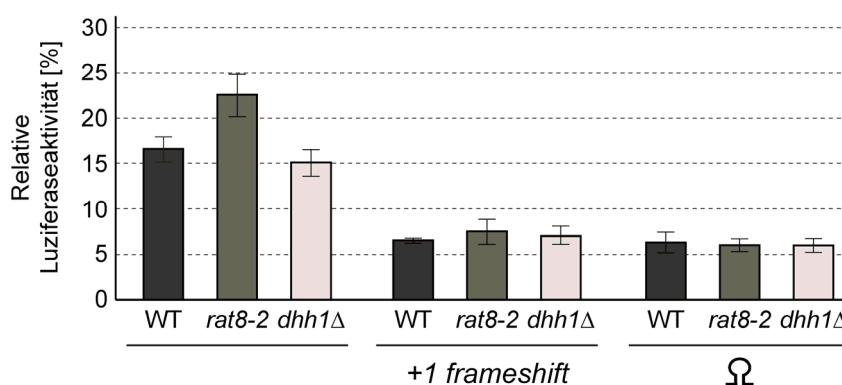


Abbildung 53: Dbp5p wird für die effiziente Erkennung des Stopp-Kodons benötigt.

Die relativen Luziferaseaktivitäten von Wildtyp (WT), der *dbp5*-Mutante *rat8-2* und der Deletionsmutante der in NMD involvierten DEAD-Box RNA-Helikase *DHH1*, *dhh1Δ*, in Anwesenheit eines der verwendeten Reporterkonstrukte mit einer spezifischen Linkerregion (* = Stopp-Kodon, +1 frameshift = Leserahmenverschiebung, Ω = Haarnadelstruktur) wurden im Vergleich zum Kontrollkonstrukt ohne Linkerregion von 15-50 unabhängigen Experimenten quantifiziert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C in Selektionsmedium angezogen und anschließend für 15 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Aktivitäten der β-Galaktosidase und der Luziferase der Reporterkonstrukte im Vergleich zum Kontrollkonstrukt gemessen und deren Verhältnisse für die Bestimmung der relativen Luziferaseaktivität genutzt.

Die Genauigkeit der Translation erfordert die Einhaltung des korrekten Leserasters. Bei dem Reporterkonstrukt mit der Leseramenverschiebung um ein Nukleotid (+1 frameshift)

muss ein alternativer Leserahmen genutzt werden, damit eine Translation der Luziferase erfolgt. Für das Einhalten des Leserahmens ist die mRNA verantwortlich, da diese über die Antikodons zweier benachbarter tRNA's mit dem 80S-Ribosom verbunden sein muss. Somit assoziieren normalerweise während der Translation zwei tRNA's mit der mRNA, da die Bindung einer neuen tRNA an die nach der Translokation freie A-Position zeitgleich mit der Ablösung der tRNA von der E-Position erfolgt. Durch die Assoziation der mRNA mit zwei tRNA's verliert das 80S-Ribosom weniger als einmal von 30.000 Übersetzungsschritten den Leserahmen. Sofern die tRNA vorzeitig von der E-Position des 80S-Ribosoms entfernt wird, so dass die mRNA nur noch über ein Antikodon der tRNA gebunden ist, besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Leserahmenverschiebung, das heißt, dem Weiterrücken der ablesenden tRNA's um mindestens ein Nukleotid auf der mRNA. Mit Hilfe des Reporterkonstruktes mit einer Leserahmenverschiebung wurde analysiert, ob Dbp5p während der Translationselongation eine Funktion besitzt und für die Einhaltung des Leserahmens verantwortlich ist. Die relative Luziferaseaktivität dieses Reporterkonstruktes zeigt zwischen Wildtyp ($6,5\% \pm 0,3\%$), den beiden *dbp5*-Mutanten, *rat8-2* ($7,5\% \pm 1,4\%$) und *rat8-3* ($7,8\% \pm 1,2\%$), und *dhh1Δ* ($7,0\% \pm 1,0\%$) keine signifikanten Unterschiede (Abb. 53 und Daten nicht gezeigt). Demzufolge hat *DBP5* keinen Einfluss auf die Genauigkeit der Leserahmenerkennung.

Zur Identifizierung, ob die RNA-entwindenden Aktivitäten von Dbp5p bei der Translation erforderlich sind, wurde das Reporterkonstrukt mit der ausgebildeten Haarnadelstruktur in der Linkerregion untersucht. Die Translation des *luc*-Genes erfordert die Entwindung dieser Sekundärstruktur. Die Analyse der relativen Luziferaseaktivitäten von diesem Reporterkonstrukt in den beiden *dbp5*-Mutanten, *rat8-2* und *rat8-3*, zeigt im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten Unterschiede ($6,0\% \pm 1,5\%$) (Abb. 53 und Daten nicht gezeigt). Demzufolge kann die Helikaseaktivität von Dbp5p diese RNA-Sekundärstruktur für die Translation nicht auflösen.

Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von *DBP5* das Wachstum von *sup45-2* und *sup35-21* bei nicht-permissiven Temperaturen fördert (Abb. 48). Des Weiteren ist bekannt, dass Translationsterminationsmutanten von *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3) Defekte in der Erkennung des Stopp-Kodons besitzen (Wakem und Sherman, 1990; Stansfield *et al.*, 1995a; Zhouravleva *et al.*, 1995). Zur Überprüfung, ob eine Überexpression von *DBP5* zu einer verbesserten Erkennung des Stopp-Kodons in *sup45-2* und *sup35-21* führt, wurden duale Luziferasereporterversuche durchgeführt. Dafür wurden die Luziferaseaktivitäten des Reporterkonstruktes, welches in der Linkerregion zwischen dem *lacZ*- und dem *luc*-Gen

ein Stopp-Kodon besitzt, in *sup45-2* und *sup35-21* mit einer Überexpression von *DBP5* analysiert.

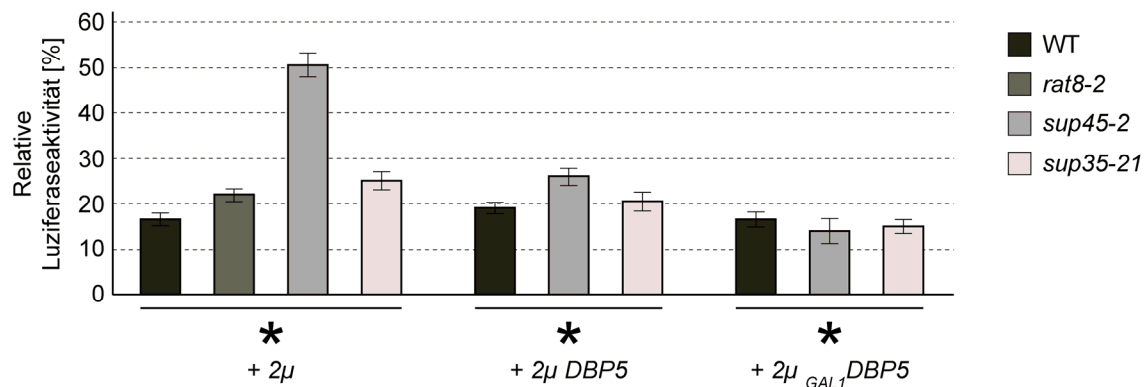


Abbildung 54: Die Überexpression von *DBP5* supprimiert die Terminationsdefekte in den Translationsmutanten *sup45-2* und *sup35-21* durch eine verbesserte Erkennung des Stopp-Kodons.

Die relativen Luziferaseaktivitäten von Wildtyp (WT), der *dbp5*-Mutante *rat8-2* sowie den beiden Translationsterminationsmutanten, *sup45-2* und *sup35-21*, in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) bzw. eines Plasmides mit einer Überexpression von *DBP5* (2μ *DBP5* bzw. 2μ *GAL1* *DBP5*) sowie eines Reporter-konstruktes mit einem Stopp-Kodon in der Linkerregion (* = Stopp-Kodon) wurden im Vergleich zum Kontrollkonstrukt ohne Linkerregion von mindestens 30 unabhängigen Experimenten quantifiziert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Selektionsmedium bei 25°C angezogen und anschließend für 15 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Aktivitäten der β -Galaktosidase und der Luziferase der Reporterkonstrukte im Vergleich zum Kontrollkonstrukt gemessen und deren Verhältnisse für die Bestimmung der relativen Luziferaseaktivität genutzt.

Aufgrund der vorliegenden Terminationsdefekte in *sup45-2* und *sup35-21* weisen diese Hefestämme in Anwesenheit eines Leervektors (2μ) eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere Luziferaseaktivität auf (Abb. 54). Da Sup45p (eRF1) für die direkte Erkennung des Stopp-Kodons notwendig ist, besitzt *sup45-2* eine stark erhöhte relative Luziferaseaktivität von $50,6\% \pm 2,6\%$. Im Gegensatz dazu ist die relative Luziferaseaktivität von *sup35-21* ($25,0\% \pm 2,0\%$) ähnlich den *dbp5*-Mutanten. Im Allgemeinen zeigt die Analyse von *sup45-2* und *sup35-21* mit einer Überexpression von *DBP5* eine reduzierte Überleserate des Stopp-Kodons und somit eine im Vergleich zum Leervektor verringerte Luziferaseaktivität. Durch die Anwesenheit eines *DBP5*-überexprimierenden Plasmides (2μ *DBP5*) sinkt die relative Luziferaseaktivität in *sup45-2* im Vergleich zum Leervektor von $50,6\% \pm 2,6\%$ auf $26,0\% \pm 1,9\%$ sowie in *sup35-21* von $25,0\% \pm 2,0\%$ auf $20,5\% \pm 2,1\%$. Durch Verwendung des *GAL1* *DBP5*-Konstruktes (2μ *GAL1* *DBP5*), das unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors steht, wird die Expressionsstärke von *DBP5* im Vergleich zum *DBP5*-Konstrukt (2μ *DBP5*) noch weiter erhöht. Diese verstärkte Expression von *DBP5* führt zu einer weiteren Reduktion der relativen Luziferaseaktivitäten in *sup45-2* auf $14\% \pm 2,7\%$ und in *sup35-21* auf $15\% \pm 1,5\%$ und somit auf eine zu Wildtyp vergleichbare relative Luziferaseaktivität von $16,5\% \pm 1,6\%$.

Es ist unklar, ob die katalytische Aktivität von Dbp5p für die Translationstermination benötigt wird. Daher wurde eine katalytisch inaktive Mutante von *DBP5*, *dbp5(E240Q)*, in den dualen Luziferasereporterversuchen untersucht, bei der das katalytisch aktive Zentrum, das DEAD-Box-Motiv, durch einen Aminosäureaustausch an der Position 240 von Glutaminsäure (E) zu Glutamin (Q) zerstört wurde. Diese Mutante kann jedoch nur zur weiteren Analyse der katalytischen Aktivität von Dbp5p verwendet werden, sofern sie ähnlich zu Dbp5p mit Polysomen ko-sedimentiert. Da Dbp5p essentiell ist und dessen katalytische Aktivität für das Überleben benötigt wird, sind Hefezellen, die ausschließlich eine Expression von *dbp5(E240Q)* aufweisen, nicht lebensfähig (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Ko-Sedimentation wurden daher Saccharose-Dichtegradientenzentrifugationen von Wildtyp mit einer zusätzlichen Expression von GFP-gekoppeltem *dbp5(E240Q)* im Vergleich zur Expression von GFP-gekoppeltem *DBP5* durchgeführt. Die Zelllysate wurden auf linearen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen, die Mono- und Polysomen durch Ultrazentrifugation von den freien ribosomalen Untereinheiten separiert und anschließend fraktioniert. Die Ko-Sedimentation von den in den einzelnen Fraktionen enthaltenden Proteinen mit den Polysomen wurde durch Western Blots quantifiziert. Obgleich *dbp5(E240Q)p* durch die Mutation in dem DEAD-Box-Motiv keine katalytische Aktivität aufweist, ko-sedimentiert *dbp5(E240Q)p* in Saccharose-Dichtegradienten zu vergleichbaren Verhältnissen wie Dbp5p mit Polysomen (Abb. 55). Demzufolge könnte *dbp5(E240Q)p*, trotz katalytischer Inaktivität, bei der Translationstermination eine unterstützende Funktion aufweisen.

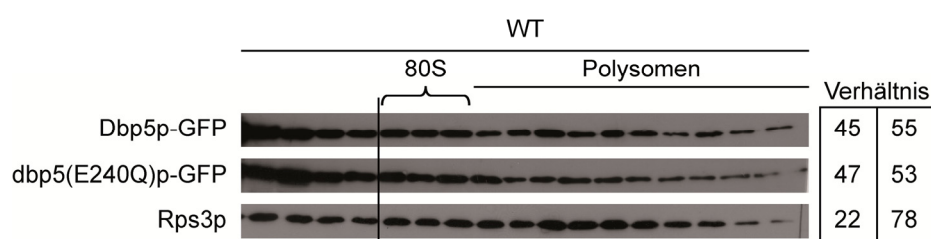


Abbildung 55: Die DEAD-Box Mutante *dbp5(E240Q)p* weist eine zu Dbp5p vergleichbare Ko-Sedimentation mit Polysomen auf.

Für die Analyse der Ko-Sedimentation wurde Wildtyp (WT) in Anwesenheit eines Plasmides mit einer Expression von mit GFP-gekoppeltem *DBP5* bzw. *dbp5(E240Q)* bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen und anschließend wurden die Lysate mittels linearer Saccharose-Dichtegradienten (15-45%) analysiert. Nach der Zentrifugation der Saccharose-Dichtegradienten für 2 h bei 40.000 rpm wurden diese fraktioniert. Die Ko-Sedimentation mit Polysomen von den in den Fraktionen enthaltenen Proteinen wurde mittels einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot untersucht. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen GFP und Rps3p verwendet. Das Verhältnis der im Western Blot detektierten Proteine und deren Ko-Sedimentation mit nicht-ribosomalen bzw. ribosomalen Fraktionen wurde von drei unabhängigen Experimenten quantifiziert (rechts). Die Fraktionen des 80S-Ribosoms (Monosom) sowie der Polysomen sind gekennzeichnet.

Daher wurde die Luziferaseaktivität von *sup45-2* mit einer Überexpression des katalytisch inaktiven *dbp5(E240Q)* analysiert. Die Überexpression wurde durch Verwendung des *GAL1dbp5(E240Q)*-Konstruktes ($2\mu_{GAL1}dbp5(E240Q)$), welches unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors steht, erzielt. In *sup45-2* reduziert sich die relative Luziferaseaktivität bei einer Überexpression von *dbp5(E240Q)* im Vergleich zum Leervektor (2μ) von $50,6\% \pm 2,6\%$ auf $44,6\% \pm 2,5\%$ (Abb. 56). Diese Reduktion ist allerdings nicht vergleichbar zu der relativen Luziferaseaktivität von *sup45-2* bei einer Überexpression von *DBP5* ($2\mu_{GAL1}DBP5$) von $14\% \pm 2,7\%$. Daher bleibt die Erkennungseffizienz des Stopp-Kodons und somit die Überseraterate durch die Überexpression des katalytisch inaktiven *dbp5(E240Q)* in *sup45-2* nahezu unverändert.

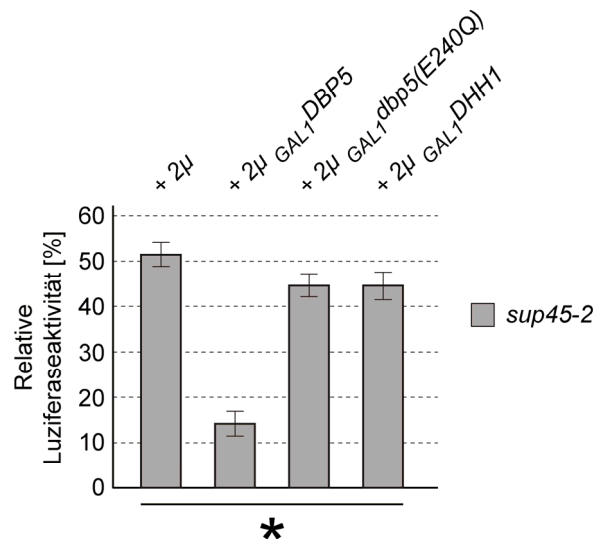


Abbildung 56: Die katalytische Aktivität von Dbp5p wird für die effiziente Erkennung des Stopp-Kodons benötigt.

Die relativen Luziferaseaktivitäten der Translationsterminationsmutante, *sup45-2*, in Anwesenheit eines Leervektors (2μ), eines Plasmides mit einer Überexpression von *DBP5* ($2\mu_{GAL1}DBP5$), von der katalytisch inaktiven *DBP5*-Mutante *dbp5(E240Q)* ($2\mu_{GAL1}dbp5(E240Q)$) bzw. von der im NMD-Prozess involvierten DEAD-Box RNA-Helikase *DHH1* ($2\mu_{GAL1}DHH1$) sowie eines Reporterkonstruktes mit einem Stopp-Kodon in der Linkerregion (* = Stopp-Kodon) wurden im Vergleich zum Kontrollkonstrukt ohne Linkerregion von mindestens 30 unabhängigen Experimenten quantifiziert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C in Selektionsmedium angezogen und anschließend für 15 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Aktivitäten der β -Galaktosidase und der Luziferase der Reporterkonstrukte im Vergleich zum Kontrollkonstrukt gemessen und deren Verhältnisse für die Bestimmung der relativen Luziferaseaktivität genutzt.

Zur Identifizierung einer spezifischen Funktion von *DBP5* während der Translationstermination wurde als Kontrolle die Überexpression der im NMD-Prozess involvierten DEAD-Box RNA-Helikase *DHH1* in *sup45-2* analysiert. Die in *sup45-2* mit einem Leervektor (2μ) durch das Überlesen des Stopp-Kodons hervorgerufene relative Luziferaseaktivität von $50,6\% \pm 2,6\%$ ist ähnlich der mit einer Überexpression von *DHH1*, die bei $44,6\% \pm 3,0\%$ liegt (Abb. 56). Daher erfolgt durch die Überexpression von *DHH1*

keine signifikante Verringerung der Luziferaseaktivität in *sup45-2* im Gegensatz zur Überexpression von *DBP5*. Da die Terminationsdefekte in *sup45-2* und *sup35-21* durch die Überexpression von *DBP5* spezifisch verringert werden, besitzt Dbp5p eine unterstützende Funktion bei der Erkennung des Stopp-Kodons auf, wobei dessen katalytische Aktivität notwendig ist.

4.11 Dbp5p hat keine offensichtliche Funktion im NMD-Prozess

Die effiziente Erkennung von Stopp-Kodons wird nicht nur bei der normalerweise stattfindenden Translationstermination, sondern auch bei der Erkennung von verfrühten Stopp-Kodons (*premature termination codons*, PTC's) benötigt (siehe Einleitung 1.7). Durch die Erkennung des PTC's wird die Translation der mRNA's, die eine anormale Proteinbiosynthese zur Folge hätte, verhindert und der zytoplasmatische Abbau dieser mRNA's im NMD-Prozess eingeleitet. In der Translationstermination sowie im NMD werden gemeinsame Faktoren verwendet. So erkennt Sup45p (eRF1) das PTC und bindet dieses verfrühte Stopp-Kodon. Des Weiteren wirkt Sup35p (eRF3) aufgrund der direkten Assoziation mit Sup45p (eRF1) stimulierend auf dieses Protein und leitet somit die anschließende Rekrutierung der Upf-Proteine ein, um aberrante mRNA's dem NMD-Prozess zuzuführen.

Zur Untersuchung, ob Dbp5p im NMD-Prozess beispielsweise bei der Erkennung von PTC's eine Funktion besitzt, wurde eine etwaige genetische Interaktion von *DBP5* mit *UPF1*, *UPF2* und *UPF3* analysiert. Da die Upf-Proteine nicht essentiell sind, wurden die *dbp5*-Doppelmutanten über Kreuzung von *rat8-2* oder *rat8-3* mit den *upf*-Deletionsstämmen *upf1Δ*, *upf2Δ* bzw. *upf3Δ* und anschließender Tetradendisektion hergestellt. Eine Wachstumsanalyse der Doppelmutanten auf Vollmediumagarplatten zeigt, dass jegliche Kombination einer *dbp5*-Mutation (*rat8-2* bzw. *rat8-3*) mit einer *UPF*-Deletion (*upf1Δ*, *upf2Δ* bzw. *upf3Δ*) im Vergleich zu den Einzelmutanten keinen Wachstumsunterschied aufweist (Abb. 57). Somit zeigt *DBP5* keine offenbaren genetischen Interaktionen mit den *UPF*'s. Zusätzlich wurde die genetische Interaktion der beiden Terminationsfaktoren *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3), die im NMD-Prozess involviert sind, mit den *UPF*'s untersucht. Über Kreuzung der *upfΔ*'s mit *sup45-2* bzw. *sup35-21* und anschließender Tetradendisektion wurden die Doppelmutanten hergestellt. Die Wachstumsanalyse dieser Doppelmutationen auf Vollmediumagarplatten zeigt, ein zu

den Einzelmутanten und den *dbp5-upf*-Doppelmutanten vergleichbares Wachstum (Abb. 57 und Daten nicht gezeigt).

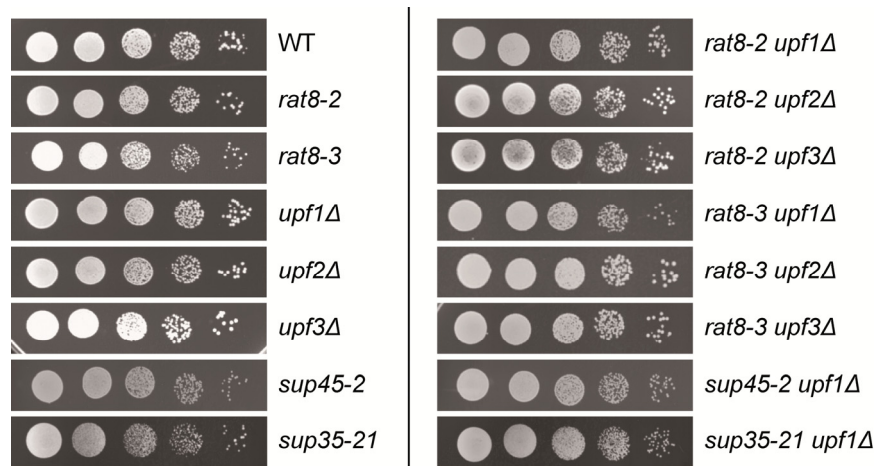


Abbildung 57: *DBP5* zeigt keine genetischen Interaktionen mit den NMD-Faktoren *UPF1*, *UPF2* und *UPF3*.

Das Wachstum von Wildtyp (WT), den beiden *dbp5*-Mutanten, *rat8-2* und *rat8-3*, den Deletionsmutanten der im NMD-Prozess involvierten *UPF*'s, *upf1Δ*, *upf2Δ* und *upf3Δ* sowie den beiden Translationsterminationsmutanten, *sup45-2* und *sup35-21*, wurde im Vergleich zu *sup45-2 upf1Δ*, *sup35-21 upf1Δ* bzw. den *dbp5*-Doppelmutanten auf Vollmediumagarplatten (YPD) nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 25°C analysiert.

Demzufolge weisen *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3) ebenso wie *DBP5* keine genetische Interaktion mit den *UPF*'s auf. Die beiden Terminationsfaktoren *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3) sind jedoch im NMD-Prozess involviert sind (Amrani *et al.*, 2006; Ivanov *et al.*, 2008). Daher kann anhand dieser Wachstumsanalysen nicht ausgeschlossen werden, dass Dbp5p ebenso eine Funktion während des NMD's besitzt. Aufgrund dessen wurden duale Luziferasereporterversuche mit dem Stopp-Kodon enthaltenen Reporterkonstrukt in den *dbp5-upf*-Doppelmutanten durchgeführt und analysiert, ob die Kombination beider Mutationen zu einer erhöhten Überleserate des Stopp-Kodons und damit zu einer Stabilisierung dieser mRNA führt. Im Allgemeinen führen jedoch Deletionen der *UPF*'s selbst zu einer Stabilisierung der mRNA's mit einem oder mehreren PTC's (Leeds *et al.*, 1992; Cui *et al.*, 1995). Demzufolge müsste ebenso bei der mRNA des Reporterkonstruktes das Stopp-Kodon überlesen werden, so dass eine erhöhte Translation der Luziferase erfolgen sollte.

Die Analyse der relativen Luziferaseaktivität des Reporterkonstruktes in den *UPF*-Deletionen zeigt, dass *upf1Δ* eine im Vergleich zum Wildtyp (16%±1,5%) erhöhte Luziferaseaktivität von 26%±1,0% aufweist, wohingegen *upf2Δ* (20%±1,0%) bzw. *upf3Δ* (21%±1,5%) nur eine leichte Erhöhung ihrer Luziferaseaktivitäten aufweisen (Abb. 58). Zum einen ist die relative Luziferaseaktivität von *rat8-2 upf1Δ* (25% ±2,0%) mit der von

upf1Δ (26% ±1,1%) vergleichbar (Abb. 58). Zum anderen zeigen die Doppelmutanten *rat8-2 upf2Δ* (26% ±1,0%) und *rat8-2 upf3Δ* (26%±1,1%) im Vergleich zu *rat8-2* (24%±2,4%) keine signifikante Erhöhung ihrer relativen Luziferaseaktivitäten (Abb. 58). Demzufolge führt jegliche Kombination einer *dbp5*-Mutation (*rat8-2* bzw. *rat8-3*) mit einer *UPF*-Deletion (*upf1Δ*, *upf2Δ* bzw. *upf3Δ*) im Vergleich zu den Einzelmутanten zu keiner erhöhten relativen Luziferaseaktivität, so dass demzufolge die in den Hefestämmen auftretenden Defekte nicht additiv sind (Abb. 58 und Daten nicht gezeigt).

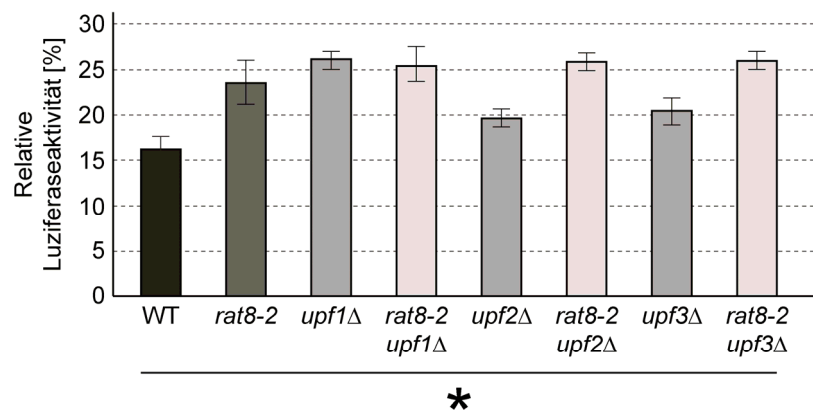


Abbildung 58: Die *dbp5-upf*-Doppelmutanten zeigen im Vergleich zu den Einzelmутanten keine additive Überleserate des Stopp-Kodons.

Die relativen Luziferaseaktivitäten von Wildtyp (WT), der *dbp5*-Mutante *rat8-2*, den Deletionsmutanten der im NMD-Prozess involvierten *UPF*s, *upf1Δ*, *upf2Δ* und *upf3Δ*, sowie den *dbp5-upf1*-Doppelmutanten in Anwesenheit eines Reporterkonstruktes mit einem Stopp-Kodon in der Linkerregion (* = Stopp-Kodon) wurden im Vergleich zum Kontrollkonstrukt ohne Linkerregion von mindestens 30 unabhängigen Experimenten quantifiziert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C in Selektionsmedium angezogen und anschließend für 15 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Aktivitäten der β -Galaktosidase und der Luziferase der Reporterkonstrukte im Vergleich zum Kontrollkonstrukt gemessen und deren Verhältnisse für die Bestimmung der relativen Luziferaseaktivität genutzt.

Zusätzlich wurde zur Aufklärung einer möglichen Funktion von Dbp5p im NMD-Prozess die Stabilität einer für den NMD spezifischen Reporter-mRNA in den *dbp5*-Mutanten analysiert. Die hierfür verwendete Reporter-mRNA, die *pgk1_{N103}*-mRNA, besitzt im Gegensatz zur Wildtyp *PGK1*-mRNA aufgrund eines Nukleotidaustausches im 22. Kodon ein PTC an dieser Position und wird über einen durch Galaktose-induzierbaren Promoter induziert (Muhlrads und Parker, 1994; Muhlrads *et al.*, 1995). Demzufolge wird diese *nonsense* mRNA in Wildtyp aufgrund des PTC's dem NMD zugeführt und letztendlich degradiert. Die Analyse mittels spezifischer semiquantitativer RT-PCR in den beiden *dbp5*-Mutanten, *rat8-2* und *rat8-3*, zeigt, dass wie in Wildtyp keine Stabilisierung der *pgk1_{N103}*-mRNA erfolgt (Abb. 58). Als Positivkontrolle für eine Anreicherung der *pgk1_{N103}*-mRNA wurde *upf1Δ* verwendet, da durch die Deletion von *UPF1* dieses Transkript nicht effizient dem NMD zugeführt und daher stabilisiert wird. Diese

Stabilisierung wird durch die erhöhte Menge des spezifischen, durch die semiquantitative RT-PCR amplifizierten Produktes der *pgk1_{N103}*-mRNA nachgewiesen (Abb. 59). Somit ist im Gegensatz zu *upf1Δ* die Menge der *pgk1_{N103}*-mRNA sowohl in Wildtyp als auch in *rat8-2* und *rat8-3* unter der Detektionsgrenze der in der semiquantitativen RT-PCR verwendeten Bedingungen. Daher wird in den beiden *dbp5*-Mutanten die *pgk1_{N103}*-mRNA dem NMD-Prozess zugeführt. Zusätzlich wurden die Stabilitäten der *pgk1_{N103}*-mRNA in Mutanten von *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3) analysiert. In *sup45-2* erfolgt ebenso wie in *upf1Δ* eine Stabilisierung der *pgk1_{N103}*-mRNA (Abb. 59). Allerdings ist in *sup45-2* diese Anreicherung der *pgk1_{N103}*-mRNA im Vergleich zu *upf1Δ* schwächer. Im Gegensatz dazu wurde in *sup35-21* keine Anreicherung der *pgk1_{N103}*-mRNA beobachtet, so dass in dieser eRF3-Mutante die *pgk1_{N103}*-mRNA dem NMD zugeführt wird.

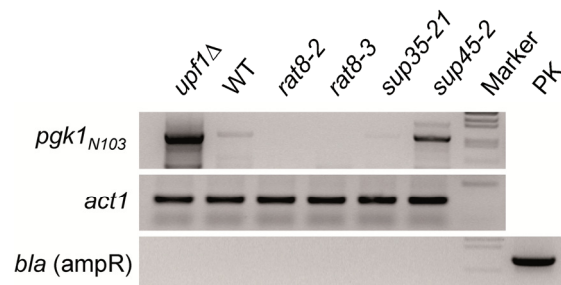


Abbildung 59: Die beiden *dbp5*-Mutanten *rat8-2* und *rat8-3* besitzen im Gegensatz zu der eRF1-Mutante *sup45-2* keinen Defekt im NMD-Prozess.

Die Menge der *pgk1_{N103}*-mRNA von Wildtyp (WT), den *dbp5*-Mutanten *rat8-2* und *rat8-3*, *upf1Δ*, sowie den beiden Translationsterminationsmutanten, *sup45-2* und *sup35-21*, wurde mittels spezifischer semiquantitativer RT-PCR analysiert. Die Hefezellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Selektionsmedium bei 25°C angezogen und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Menge der *pgk1_{N103}*-mRNA mittels spezifischer RT-PCR semiquantitativ analysiert. Zum Ausschluss einer DNA-Kontamination wurde zum einen eine plasmidspezifische PCR des Beta-Laktamasegens (*bla*), welches für die Ampicillinresistenz kodiert (ampR), durchgeführt (PK: Positivkontrolle, Plasmid-DNA). Zum anderen wurde mittels einer RT-PCR der Actin-mRNA (*act1*) eine gDNA-Kontamination ausgeschlossen, da die verwendeten Primer Exon-Exon-Grenzen übergreifend waren. Diese diente parallel als Kontrolle der gleichmäßig eingesetzten mRNA-Gesamtmenge.

4.12 Dbp5p reguliert die Sup45p-Sup35p-Interaktion und die Rekrutierung von Sup35p in den Terminationskomplex

Die Ergebnisse der dualen Luziferasereporterversuche, in denen gezeigt wurde, dass die katalytische Aktivität von Dbp5p für die effiziente Erkennung des Stopp-Kodons benötigt wird, sowie die genetischen Interaktionen von *DBP5* mit *SUP45* (eRF1), *SUP35* (eRF3) und *PAB1* weisen auf eine aktive Funktion von Dbp5p bei der Translationstermination hin. Daher wurde die direkte Assoziation von Dbp5p mit diesen Proteinen untersucht. Durch eine Ko-IP von Dbp5p-myc mit Pab1p-GFP wurde eine indirekte, RNase-sensitive Interaktion beider Proteine nachgewiesen (Daten von Dorotheè Sturm; Gross *et al.*, 2007).

Durch die Behandlung der Lysate mit RNase A erfolgt eine hydrolytische Spaltung der mRNA an den Positionen, die nicht von Proteinen, z.B. den Ribosomen, geschützt werden, geht die Interaktion zwischen Dbp5p und Pab1p verloren. Diese indirekte Interaktion erfolgt daher durch die Präsenz beider Proteine auf den gleichen mRNA's allerdings an verschiedenen Positionen, so dass Dbp5p und Pab1p nicht in einem Proteinkomplex miteinander assoziieren.

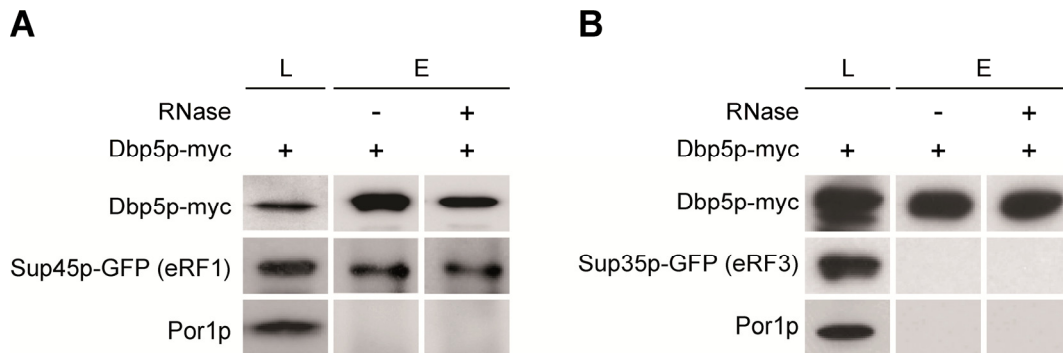


Abbildung 60: Dbp5p interagiert physikalisch mit Sup45p (eRF1), jedoch nicht mit Sup35p (eRF3).

Die *in vivo* Interaktion von Dbp5p mit den beiden Translationsterminationsfaktoren Sup45p (eRF1) (A) und Sup35p (eRF3) (B) wurde in Wildtyp durch eine Ko-IP von Dbp5p-myc mit Hilfe eines myc-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot analysiert. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen myc, GFP bzw. Por1p verwendet (L = Lysat, E = Eluat).

Für den Nachweis der physikalischen Interaktion von Dbp5p mit Sup45p bzw. Sup35p wurden weitere Ko-IP's durchgeführt. Die Ko-IP von Dbp5p-myc zeigt eine RNase-insensitive und somit eine direkte Interaktion von Dbp5p-myc mit Sup45p-GFP, da sowohl mit als auch ohne RNase-Behandlung der Lysate Sup45p-GFP im Western Blot in den Eluatn detektiert wird (Abb. 60A). Im Gegensatz dazu ist unter gleichen Bedingungen in der Ko-IP von Dbp5p-myc keine Interaktion mit Sup35p-GFP nachweisbar (Abb. 60B).

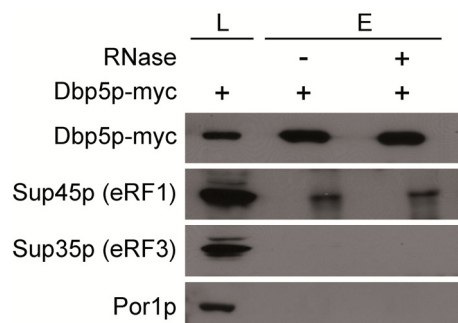


Abbildung 61: Dbp5p interagiert physikalisch mit endogen exprimiertem Sup45p (eRF1), jedoch nicht mit endogen exprimiertem Sup35p (eRF3).

Die *in vivo* Interaktion von Dbp5p mit den beiden Translationsterminationsfaktoren Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) wurde in Wildtyp durch eine Ko-IP von Dbp5p-myc mit Hilfe eines myc-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot analysiert. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen myc, Sup45p, Sup35p bzw. Por1p verwendet (L = Lysat, E = Eluat).

Ebenso ist nach Veränderung der Bedingungen der Ko-IP, wie Pufferzusammensetzung, keine Interaktion von Dbp5p mit Sup35p (eRF3) detektierbar (Daten nicht gezeigt). Da die Interaktion zwischen Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) über die jeweiligen carboxyterminalen Regionen erfolgt, könnten die Anhänge der Proteine (GFP bzw. myc) einen störenden Einfluss auf die Detektion einer möglichen Interaktion von Dbp5p mit Sup35p (eRF3) ausüben. Aufgrund dessen wurden Ko-IP's von Dbp5p-myc mit endogen exprimiertem Sup45p (eRF1) bzw. Sup35p (eRF3) durchgeführt. Diese Ko-IP's zeigen ebenso eine RNase-insensitive Interaktion von Dbp5p-myc mit endogenem Sup45p, wohingegen unter gleichen Bedingungen erneut keine Interaktion mit in diesem Fall endogenem Sup35p nachweisbar ist (Abb. 61).

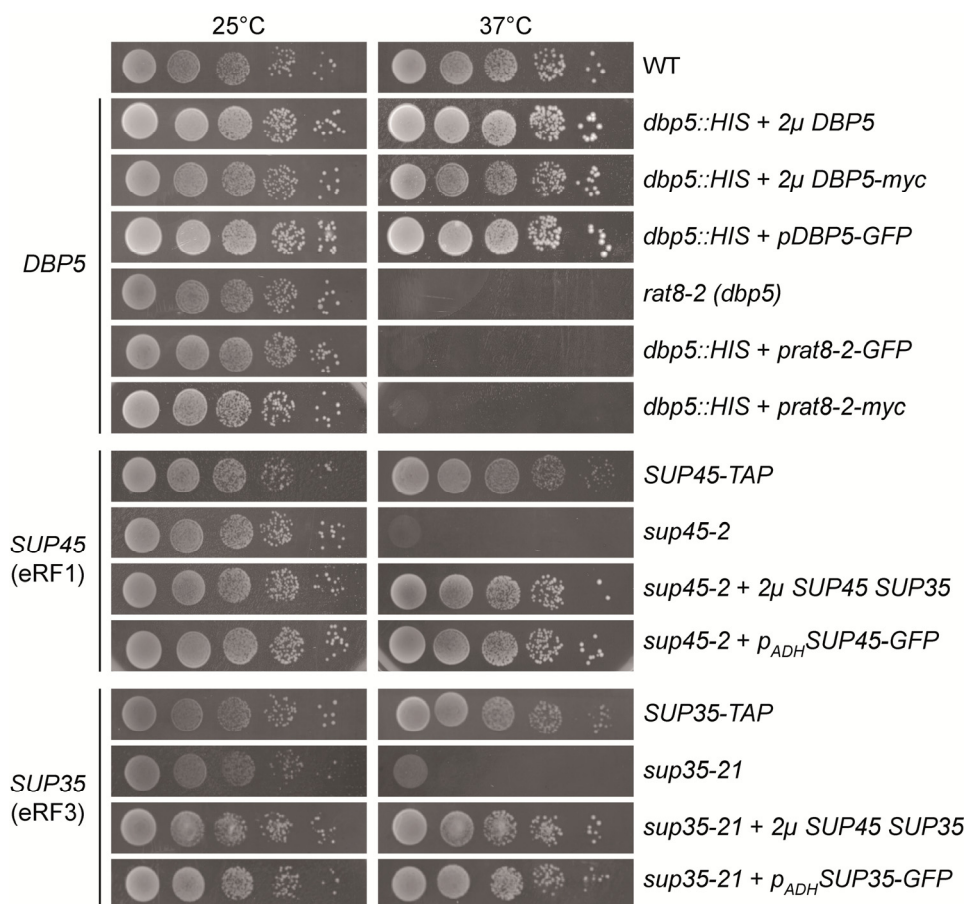


Abbildung 62: Die Expression der mit GFP-, myc- bzw. TAP-gekoppelten Versionen von DBP5/rat8-2, SUP45 (eRF1) bzw. SUP35 (eRF3) führt nicht zu Wachstumsdefekten.

Die Funktionalität der mit GFP-, myc- bzw. TAP-gekoppelten Versionen wurde mittels Wachstumsanalyse überprüft. Das Wachstum der jeweiligen gekoppelten Versionen wurde im Vergleich zum Wildtyp auf Vollmediumagarplatten (YPD) nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 25°C bzw. 37°C analysiert.

Des Weiteren wurde die Funktionalität der gekoppelten Proteine mittels Wachstumsanalysen von verschiedenen Hefestämmen getestet. Zum einen zeigen Hefestämme, die ausschließlich eine Expression von myc- oder GFP-gekoppeltem DBP5 bzw. der

dbp5-Mutante *rat8-2* aufweisen, bei 25°C ein zu Wildtyp unverändertes Wachstum (Abb. 62). Durch die Inkubation bei 37°C sind die *dbp5*-Mutanten mit oder ohne Anhang aufgrund der Temperatursensitivität nicht lebensfähig. Zum anderen wachsen die temperatursensitiven Mutanten *sup45-2* und *sup35-21*, die eine zusätzliche Expression der GFP-gekoppelten Version von *SUP45* (eRF1) bzw. *SUP35* (eRF3) aufweisen, bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C ähnlich dem Wildtyp (Abb. 62). Demzufolge werden die essentiellen Funktionen von Dbp5p, Sup45p (eRF1) bzw. Sup35p (eRF3) durch die jeweiligen gekoppelten Versionen vollständig ersetzt.

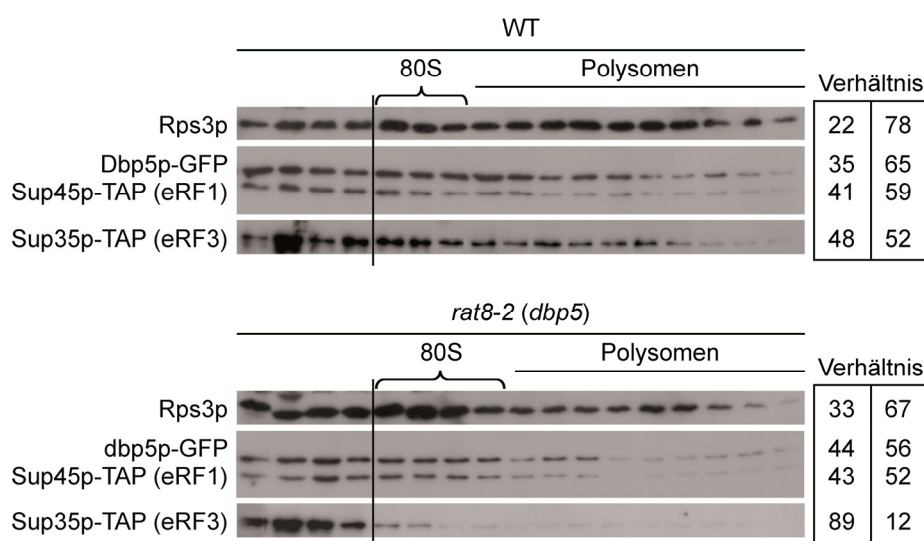


Abbildung 63: Dbp5p wird für die Rekrutierung von Sup35p (eRF3) in die Translationsterminationskomplexe benötigt.

Für die Analyse der Ko-Sedimentation wurden Wildtyp (WT) und die *dbp5*-Mutante *rat8-2* bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen und anschließend für 20 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Lysate mittels linearer Saccharose-Dichtegradienten (15-45%) analysiert. Nach der Zentrifugation der Saccharose-Dichtegradienten für 2 h bei 40.000 rpm wurden diese fraktioniert. Die Ko-Sedimentation mit Polysomen von den in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurde mittels einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot untersucht. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen GFP und Rps3p verwendet. Da der sekundäre Antikörper gegen Kaninchen das Protein A bindet, war dieser ausreichend für die Detektion des TAP-Anhangs. Das Verhältnis der im Western Blot detektierten Proteine und deren Ko-Sedimentation mit nicht-ribosomalen bzw. ribosomalen Fraktionen wurde von 3 unabhängigen Experimenten quantifiziert (rechts). Die Fraktionen des 80S-Ribosoms (Monosom) sowie der Polysomen sind gekennzeichnet.

Bei der Translationstermination erfolgt eine direkte Assoziation von Sup45p (eRF1) mit Sup35p (eRF3), so dass über diese Interaktion der Terminationsprozess koordiniert wird. Die physikalische Interaktion zwischen Dbp5p und Sup45p (eRF1) im Gegensatz zu der nicht detektierbaren Proteininteraktion mit Sup35p (eRF3) stellt gewissermaßen ein Paradoxon dar. Beide Terminationsfaktoren liegen in einem Proteinkomplex vor, demzufolge sollte ebenso eine Interaktion von Dbp5p mit Sup35p (eRF3) zu erwarten sein. Um diese offensichtliche Widersprüchlichkeit zu klären, wurde die Ko-Sedimentation von Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) mit Polysomen in der *dbp5*-Mutante *rat8-2* analysiert.

Die Saccharose-Dichtegradienten von Wildtyp und *rat8-2* zeigen, dass das *rat8-2p*-GFP (*dbp5p*-GFP) im ähnlichen Verhältnis wie das wildtypische *Dbp5p*-GFP mit Polysomen ko-sedimentiert (Abb. 63). Daher erfolgt in *rat8-2* trotz des mRNA-Exportdefekts keine reduzierte Assoziation von *rat8-2p*-GFP (*dbp5p*-GFP) mit den sich in der Translation befindlichen mRNA's. Des Weiteren ist *Sup45p* (eRF1) in *rat8-2* trotz reduzierter Proteinmenge im gleichen Verhältnis wie in Wildtyp mit Polysomen assoziiert. Allerdings zeigt *rat8-2* im Gegensatz zum Wildtyp eine stark verringerte Ko-Sedimentation von *Sup35p* (eRF3) mit Polysomen. Daraus lässt sich ableiten, dass in der *dbp5*-Mutante die Rekrutierung von *Sup35p* (eRF3) in den Terminationskomplex gestört ist.

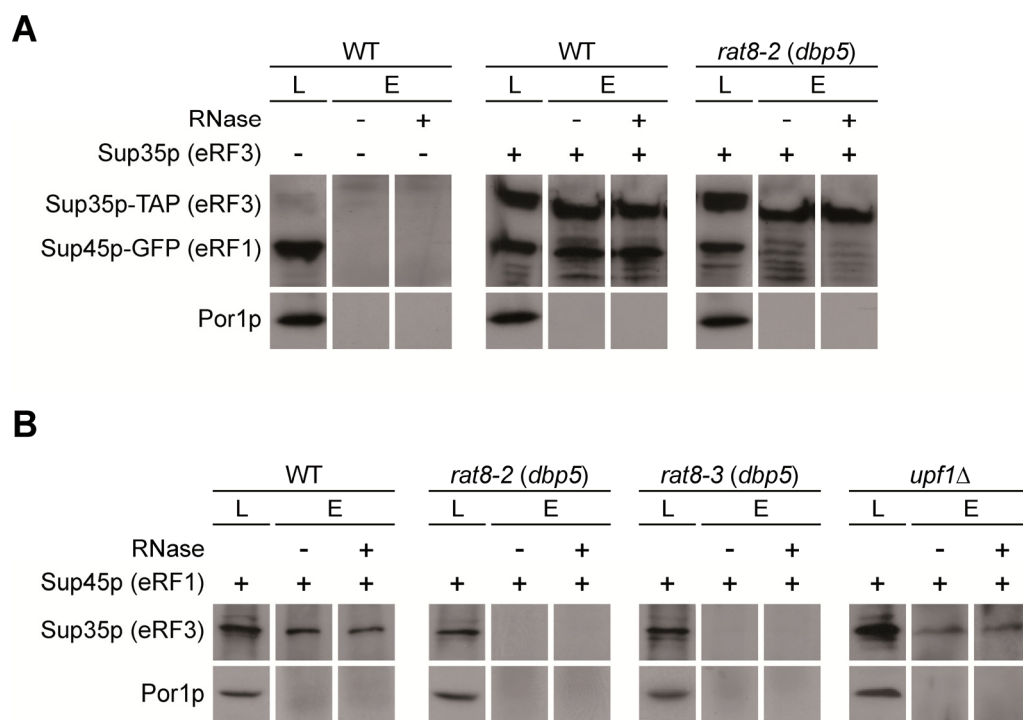


Abbildung 64: *Dbp5p* reguliert die *Sup45p* (eRF1)-*Sup35p* (eRF3)-Interaktion.

(A) Die *in vivo* Interaktion von *Sup45p* (eRF1) und *Sup35p* (eRF3) wurde in Wildtyp und der *dbp5*-Mutante *rat8-2* durch eine Ko-IP von *Sup45p*-TAP mit Hilfe eines Isotyp-spezifischen Antikörpers und anschließendem Western Blot analysiert. Die Hefezellen wurden dafür bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Selektionsmedium bei 25°C angezogen und anschließend für 20 min bei 37°C inkubiert. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen GFP bzw. Por1p verwendet. Da der sekundäre Antikörper gegen Kaninchen das Protein A bindet, war dieser ausreichend für die Detektion des TAP-Anhangs (L = Lysat, E = Eluat). (B) Die *in vivo* Interaktion von *Sup45p* (eRF1) und *Sup35p* (eRF3) wurde in Wildtyp, den beiden *dbp5*-Mutanten, *rat8-2* und *rat8-3*, sowie in der NMD-defizienten Mutante *upf1Δ* durch eine Ko-IP von endogen exprimiertem *Sup45p* mit Hilfe eines *Sup45p*-spezifischen Antikörpers mittels Western Blot analysiert. Die Hefezellen wurden dafür bis zur logarithmischen Wachstumsphase in Selektionsmedium bei 25°C angezogen und anschließend für 20 min bei 37°C inkubiert. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen *Sup35p* bzw. Por1p verwendet (L = Lysat, E = Eluat).

Das veränderte Verhältnis der Ko-Sedimentation von *Sup35p* (eRF3) mit Polysomen in *rat8-2* offenbart einen Rekrutierungsdefekt von *Sup35p* (eRF3) in den Terminationskomplex. Demzufolge müsste die Assoziation von *Sup45p* (eRF1) mit *Sup35p* (eRF3) in

dbp5-Mutanten ebenfalls vermindert sein. Zur Analyse, ob mutiertes *Dbp5p* einen Einfluss auf die physikalische Interaktion zwischen den beiden Terminationsfaktoren besitzt, wurde eine Ko-IP von Sup35p-TAP mit Sup45p-GFP in *rat8-2* durchgeführt. In der *dbp5*-Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp kein Sup45p-GFP in den Eluaten detektierbar, so dass durch mutiertes *Dbp5p* die Assoziation von Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) verhindert wird (Abb. 64A). Zum Ausschluss, dass die Anhänge der Proteine (GFP bzw. TAP) einen störenden Einfluss auf die Detektion besitzen, wurde eine Ko-IP durchgeführt, in der Antikörper gegen endogen exprimiertes Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) verwendet wurden. Die Analyse der physikalischen Interaktion beider Translations-terminationsfaktoren zeigt, dass die Assoziation von endogenem Sup35p (eRF3) mit Sup45p (eRF1) in *rat8-2* und *rat8-3* ebenfalls nicht vorhanden ist (Abb. 64B). Zusätzlich wurde als Kontrolle die Interaktion von Sup45p (eRF1) mit Sup35p (eRF3) in *upf1Δ* analysiert. In *upf1Δ* ist in den Eluaten im Gegensatz zu den *dbp5*-Mutanten Sup35p detektierbar, so dass die Deletion von *UPF1* keinen zu den *dbp5*-Mutanten vergleichbaren Defekt in der Sup45p (eRF1)-Sup35p (eRF3) -Interaktion aufweist. Demzufolge ist *Dbp5p* für die Rekrutierung von Sup35p (eRF3) verantwortlich und reguliert über diese Funktion die Interaktion zwischen den beiden Terminationsfaktoren Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3).

5 Diskussion

Für die einzelnen Prozesse bei der Genexpression, beginnend mit der Transkription bis hin zur Translation, und deren Regulation werden zahlreiche Proteine benötigt. Viele dieser Proteine sind nicht nur in einem Prozess involviert, sondern verbinden mehrere Prozesse miteinander. So besitzen beispielsweise die mRNA-bindenden Proteine nicht nur beim mRNA-Export wichtige Funktionen, sondern können ebenso an der Transkription bzw. an der Regulation dieser beteiligt sein. Zu den mRNA-bindenden Proteinen gehört das pendelnde SR-Protein Npl3p aus *S. cerevisiae*, welches am mRNA-Export involviert ist und im Gegensatz zu anderen pendelnden, mRNA-bindenden Proteinen mit Polysomen assoziiert. Neben Npl3p besitzt die mRNA-bindende DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p essentielle Funktionen beim mRNA-Export. Obgleich dieses Protein vorwiegend an der Zellkernmembran angereichert vorliegt, um die Translokation der mRNA durch den NPC zu gewährleisten, ist das Protein ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert und assoziiert mit Polysomen. Aufgrund dieser Tatsachen ist die Aufklärung etwaiger zytoplasmatischer Funktionen beider Proteine von besonderem Interesse.

5.1 Npl3p ist ein genereller Exportfaktor für die mRNA

Die Funktionen von Npl3p im mRNA-Export waren bereits vor Beginn dieser Arbeit bekannt und durch zahlreiche Studien charakterisiert. So wurde in den ersten Studien gezeigt, dass Npl3p zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelt und mit Hilfe der beiden RRM's direkt RNA binden kann (Bossie *et al.*, 1992; Schlenstedt *et al.*, 1993; Flach *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1994; Russell und Tollervey, 1995). Darüber hinaus weisen Mutanten von *NPL3* Defekte bei nukleär-zytoplasmatischen Transportvorgängen, wie dem mRNA-Export, auf (Singleton *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Saavedra *et al.*, 1997; Krebber *et al.*, 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von Npl3p an die prä-mRNA frühzeitig über die Transkriptionsmaschinerie erfolgt, wodurch es regulierend auf die Prozessierung der 3'-Region der prä-mRNA wirkt (Burkard und Butler, 2000; Shen *et al.*, 2000; Lei *et al.*, 2001; Bucheli und Buratowski, 2005; Bucheli *et al.*, 2007; Deka *et al.*, 2008; Dermody *et al.*, 2008). Zusätzlich fungiert Npl3p beim mRNA-Export als Adapter für das Exportrezeptorheterodimer Mex67p-Mtr2p (Gilbert und Guthrie, 2004). Obwohl diese Funktionen von Npl3p im Allgemeinen essentiell sind, existieren lebensfähige Hefezellen im *BY*-Stammhintergrund mit einer Deletion von *NPL3*

(Brachmann *et al.*, 1998; Winzeler *et al.*, 1999), in denen interessanterweise keine mRNA-Exportdefekte vorhanden sind (Abb. 13). Allerdings akkumuliert die zytoplasmatisch lokalisierte Variante von Npl3p, npl3_p, in mRNA-Export-defizienten Mutanten des *BY*-Stammhintergrundes, wie *rat7-1* bzw. *mtr2-21*, im Zellkern (Abb. 15 und Abb. 20). Dies verdeutlicht, dass Npl3p im Wildtyp des *BY*-Stammhintergrundes dennoch am Export der mRNA beteiligt ist. Zusätzlich weist das im Vergleich zu den Einzelmutanten eingeschränkte Wachstum von *npl3Δ mtr2-21* auf eine genetische Interaktion von *NPL3* mit *MTR2* hin (Abb. 21). Daher könnte der Transport der mRNA's in das Zytoplasma in den verschiedenen Hefestämmen auf eine ähnliche Art und Weise erfolgen. Die beteiligten Proteine, die letztendlich das reife mRNP ausbilden und dieses zum Export befähigen, können jedoch variieren. Diese variable Proteinzusammensetzung ist allerdings nicht nur beim regulären mRNA-Export notwendig, sondern auch bei veränderten Umweltbedingungen, wie Temperatur oder Osmolarität (Salzkonzentration), erforderlich (Liu *et al.*, 1996; Saavedra *et al.*, 1997; Krebber *et al.*, 1999; Vainberg *et al.*, 2000; Gallouzi und Steitz, 2001; Rollenhagen *et al.*, 2007). Demnach kann eine gleichartige Zusammensetzung der Proteine des mRNP's nicht die Regel sein, so dass die unterschiedlichen pendelnden Proteine den effizienten, regulierten Transport der verschiedenen mRNA's gewährleisten (Zenklusen und Stutz, 2001; Erkmann und Kutay, 2004; Cole und Scarcelli, 2006; Kohler und Hurt, 2007; Stewart, 2007).

Der bislang einzig für den mRNA-Export beschriebene Exportrezeptor Mex67p assoziiert mit lediglich ~20% der transkribierten mRNA's (Hieronymus und Silver, 2003). Daher scheint der Transport der mRNA's in das Zytoplasma über verschiedene Mechanismen zu erfolgen, so dass den involvierten Proteinen eine unterschiedliche Bedeutung in den einzelnen Stammhintergründen zukommen könnte. Die Wachstumsdefekte von *npl3Δ gbp2Δ* sowie *npl3Δ hrb1Δ* und die synthetische Letalität der Hefezellen mit kombinierter Deletion dieser drei in *S. cerevisiae* bekannten SR-Proteine (Abb. 16) verdeutlichen eine genetische Interaktion von *NPL3* mit *GBP2* und *HRB1*. Dies zeigt zusätzlich, dass Gbp2p und Hrb1p aufgrund der hohen Homologie zu Npl3p redundante Funktionen, z.B. beim mRNA-Export, aufweisen können. Die Tatsache, dass die Kombination der Deletion von zwei SR-Proteinen zu keinem mRNA-Exportdefekt führt (Abb. 17), weist zusätzlich auf weitere pendelnde mRNA-Exportproteine mit redundanten Funktionen zu Npl3p hin.

5.2 Npl3p ist ein neuer Exportfaktor für die ribosomale prä-60S-Untereinheit

Zahlreiche pendelnde, mRNA-bindende Proteine, wie das Exportrezeptorheterodimer Mex67p-Mtr2p (Lund und Guthrie, 2005), dissoziieren kurz nach dem Transport des mRNP's in das Zytoplasma von der mRNA und werden anschließend in den Zellkern re-importiert. Im Gegensatz dazu verbleibt Npl3p während des Translationsprozesses an dem mRNP (Gratzer *et al.*, 2000; Windgassen *et al.*, 2004). Des Weiteren ist die koordinierte Dissoziation von Npl3p von der mRNA für eine effiziente Translation notwendig, da eine Mutante von *NPL3*, *npl3-27*, eine verringerte Dissoziation von *npl3-27p* aufweist, die zu Translationsdefekten führen (Windgassen *et al.*, 2004). Jedoch könnte diese Translationsinhibition durch *npl3-27p* passiv aufgrund dessen verlängerten Assoziation mit Ribosomen-assoziierten mRNA's entstehen. Die Analyse einer möglichen zytoplasmatischen Funktion von Npl3p während der Translation ist jedoch kompliziert, da alle existierenden, temperatursensitiven *npl3*-Mutanten im *S288C*-Stammhintergrund mRNA-Exportdefekte aufweisen (Singleton *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Saavedra *et al.*, 1997; Krebber *et al.*, 1999). Diese könnten letztendlich zu Sekundäreffekten, wie einer reduzierten Translation führen. Aufgrund dessen wurden Hefezellen des *BY*-Stammhintergrundes verwendet, in denen die Beteiligung von Npl3p am mRNA-Export zwar vorhanden, allerdings nicht essentiell ist. Im Gegensatz zu anderen Stammhintergründen ist die Deletion von *NPL3* in diesem lebensfähig, obgleich *npl3Δ* im Vergleich zum Wildtyp ein reduziertes Wachstum bei 25°C bzw. 37°C aufweist (Abb. 12). Interessanterweise wird dieses weder durch eine verringerte Transkription noch durch einen defekten mRNA-Export hervorgerufen (Daten von Alexandra Hackmann, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung und Abb. 13). Stattdessen wird der Wachstumsdefekt von *npl3Δ* durch eine verringerte Translationsrate verursacht (Abb. 14).

Zur Identifizierung der Ursache für den Translationsdefekt wurde zunächst der Transport der ribosomalen Untereinheiten in das Zytoplasma untersucht, da etwaige Exportdefekte die Anzahl an 80S-Ribosomen im Zytoplasma verringern und infolgedessen die Translationseffizienz beeinträchtigen können. Tatsächlich weist *npl3Δ* im *BY*-Stammhintergrund Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit im Vergleich zum Wildtyp auf, wohingegen der Transport der prä-40S-Untereinheit in das Zytoplasma unbeeinflusst ist (Abb. 18). Außerdem akkumuliert die prä-60S-Untereinheit ebenfalls in *npl3*-Mutanten des *S288C*-Stammhintergrundes im Zellkern (Abb. 19) (Stage-Zimmermann *et al.*, 2000). Dies

verdeutlicht eine generelle Funktion von Npl3p unabhängig des Stammhintergrundes. Allerdings zeigen die einzelnen *npl3*-Mutanten vermutlich aufgrund der verschiedenen, spezifischen Mutationen von *NPL3* einen unterschiedlich starken Exportdefekt der prä-60S-Untereinheit (Abb. 19).

Zur weiteren Charakterisierung der Funktion von Npl3p beim Export der prä-60S-Untereinheit wurden Interaktionsstudien mit Proteinen durchgeführt, die mit der prä-60S-Untereinheit assoziieren. Während der Ribosomenbiogenese im Zellkernkörperchen wechselwirkt Rix1p mit dem prä-90S-Ribosom (Bassler *et al.*, 2001; Galani *et al.*, 2004). Dieses Protein assoziiert nach der Spaltung des prä-90S-Ribosoms in die prä-40S- und die prä-60S-Untereinheit alleinig mit der prä-60S-Untereinheit. Nach dem Transport dieser in den Zellkern erfolgt die Dissoziation von Rix1p. Ein weiteres Protein, Arx1p, wird hingegen erst im Zellkern an die prä-60S-Untereinheit rekrutiert, wobei die Assoziation ebenso während des Translokationsprozess erhalten bleibt (Bradatsch *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008). Die Interaktionsanalysen zeigten, dass Npl3p sowohl mit dem nukleären Ribosomenbiogenesefaktor Rix1p als auch dem nicht-essentiellen, helfenden Exportadapterprotein Arx1p sowie den ribosomalen Proteinen Rpl25p und Rpl10p physikalisch interagiert (Abb. 22 und Abb. 36). Demnach wurde Npl3p aufgrund der direkten Assoziation mit der prä-60S-Untereinheit als ein neues Adapterprotein für die prä-60S-Untereinheit charakterisiert.

Die direkte Assoziation von Rpl25p, einem ribosomalen Protein der 60S-Untereinheit, mit der 35S rRNA des prä-90S-Ribosoms erfolgt bereits im Zellkernkörperchen (El-Baradi *et al.*, 1984; el-Baradi *et al.*, 1985; Yeh und Lee, 1998). Im Gegensatz dazu wird das ribosomale Protein Rpl10p erst in einem späten Schritt der ribosomalen Prozessierung im Zytoplasma an die prä-60S-Untereinheit rekrutiert wird (Pachler *et al.*, 2004; Hedges *et al.*, 2005; West *et al.*, 2005; Hedges *et al.*, 2006). Daher deuten die physikalischen Interaktionen von Npl3p mit Rix1p, Arx1p und den ribosomalen Proteinen Rpl25p und Rpl10p (Abb. 22, Abb. 36 und Daten nicht gezeigt) auf die Assoziation von Npl3p mit der prä-60S-Untereinheit sowohl während den nukleären Reifungsprozessen, dem Export als auch den zytoplasmatischen Prozessierungen hin.

Bei der Transkription erfolgt über die Transkriptionsmaschinerie eine frühzeitige Rekrutierung von Npl3p an die prä-mRNA (Lei *et al.*, 2001). Interessanterweise assoziiert Npl3p im Gegensatz zu anderen Exportadapterproteinen, wie Arx1p (Bradatsch *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2008) und Nmd3p (Ho und Johnson, 1999; Nissan *et al.*, 2002), frühzeitig mit dem 35S rRNA enthaltenden prä-90S-Ribosom im Zellkernkörperchen (Daten von Alexandra

Hackmann, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung). Derzeit ist allerdings unklar, ob diese Rekrutierung über die rRNA-Synthesemaschinerie erfolgt und somit Analogien zu der Rekrutierung von Npl3p an die prä-mRNA aufweist.

Npl3p bindet über seine beiden RRM's direkt und bevorzugt an RNA-Sequenzen mit Anhäufungen der Basen Guanin und Uracil (Deka *et al.*, 2008). Weiterhin zeigten RNA-Bindungsstudien, dass Npl3p *in vitro* direkt mit RNA-Sequenzen der 25S rRNA, assoziieren kann (Abb. 23). Daher scheint es wahrscheinlich, dass die Assoziation von Npl3p mit der prä-90S-Untereinheit über die 25S rRNA-Region der 35S rRNA erfolgt, so dass Npl3p nach der im Zellkernkörperchen stattfindenden Spaltung der 35S rRNA weiterhin an der 25S rRNA der prä-60S-Untereinheit verbleibt. Allerdings ist unklar, ob über eine spezifische Rekrutierung von Npl3p die Position(en) dieser Assoziation mit der rRNA bestimmt werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Npl3p *in vivo* nicht nur mit der 25S rRNA, sondern mit einer Vielzahl weiterer unterschiedlichen RNA-Typen, wie der 18S rRNA, der 5S rRNA, den Box H/ACA snoRNA's, verschiedenen snRNA's (U1, U2, U4, U5 und U6) und diversen tRNA's, assoziiert (Gottschalk *et al.*, 1998; Krogan *et al.*, 2004; Kim Guisbert *et al.*, 2005). Dies weist auf eine generelle RNA-Bindefunktion von Npl3p hin.

5.2.1 Npl3p ist nicht an der rRNA-Prozessierung im *BY*-Stammhintergrund beteiligt

An der präzisen, räumlich und zeitlich koordinierten Biogenese der Ribosomen sind neben den ribosomalen Proteinen mehr als 150 nicht-ribosomale Faktoren beteiligt (Nissan *et al.*, 2002). So treten nach einer langanhaltenden Depletion (24 h) von Npl3p im essentiellen S288C-Stammhintergrund sekundäre Effekte, wie Prozessierungsdefekte der rRNA oder ein eingeschränkter Proteinimport, auf (Bossie *et al.*, 1992; Russell und Tollervey, 1992; Schlenstedt *et al.*, 1993; Long *et al.*, 1997). Diese Depletion von Npl3p führt zu Defekten bei einem späten Schritt der rRNA-Prozessierung, bei dem die 27S rRNA zur 25S rRNA und die 20S rRNA zur 18S rRNA katalytisch gespalten wird (Russell und Tollervey, 1992). Da die durchschnittliche Verdopplungszeit von Hefezellen ca. 90 min beträgt, könnten diese rRNA-Prozessierungsdefekte sekundäre Effekte aufgrund der langanhaltenden Depletion (24 h) von Npl3p darstellen.

Da der Export von den unreifen und nicht-prozessierten prä-ribosomalen Untereinheiten durch verschiedene Kontrollmechanismen verhindert wird, muss ausgeschlossen werden,

dass die Misslokalisationsdefekte der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* durch Prozessierungsdefekte der rRNA's verursacht werden. So zeigen Mutanten von Proteinen, die in unterschiedlichen Phasen der rRNA-Prozessierung involviert sind, wie Rix1p, Nsr1p, Nop1p oder Mtr4p, Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit (Stage-Zimmermann *et al.*, 2000; Bassler *et al.*, 2001). Da jedoch *npl3Δ* im *BY*-Stammhintergrund keine offensichtlichen Prozessierungsdefekte aufweist (Daten von Alexandra Hackmann, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung), sind essentielle Funktionen von Npl3p bei der rRNA-Prozessierung in diesem Stammhintergrund unwahrscheinlich. Außerdem wird die nukleäre Misslokalisation der prä-60S-Untereinheit durch die Überexpression der Exportfaktoren *MTR2* bzw. *NMD3* in *npl3Δ* im Gegensatz zu *rix1-1* vollständig supprimiert (Abb. 26A und Abb. 28). Demzufolge wird aufgrund der Kontrollmechanismen ebenso nach Überexpression von *MTR2* und *NMD3* der Export der unreifen prä-ribosomalen Untereinheiten in der Ribosomenbiogenesemutante *rix1-1* verhindert. Des Weiteren ist die Doppelmutante *npl3Δ rix1-1* lebensfähig und im Gegensatz zu der Kombination von *npl3Δ* mit der Mutante *xpo1-1*, in der der Export der prä-60S-Untereinheit inhibiert ist, nicht synthetisch letal (Abb. 21 und Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigt *NPL3* keine genetischen Interaktionen mit den Genen *RPA12*, *RPA14* oder *RPA49*, die für Komponenten der RNA-Polymerase I kodieren und daher für die Synthese der 35S rRNA benötigt werden (Daten nicht gezeigt). Demnach werden die Misslokalisationsdefekte der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* höchstwahrscheinlich nicht durch Prozessierungsdefekte verursacht.

Zusätzlich unterstützen die durch das reduzierte Wachstum der *npl3*-Doppelmutanten mit *mtr2-33* bzw. *nmd3-2* ermittelten genetischen Interaktionen von *NPL3* mit den beiden Exportproteinen *MTR2* und *NMD3* die Funktion von Npl3p beim Transport der prä-60S-Untereinheit (Abb. 21). Interessanterweise sind die Wachstumsdefekte in *npl3Δ mtr2-21* im Vergleich zu *npl3Δ mtr2-33* geringer (Abb. 21). Dies beruht vermutlich auf der Tatsache, dass *mtr2-33* spezifisch Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit und *mtr2-21* einen reduzierten mRNA-Export aufweist (Bassler *et al.*, 2001). Demzufolge sind in *npl3Δ mtr2-21* zwei unterschiedliche Exportwege (mRNA und prä-60S-Untereinheit) gestört, wohingegen in *npl3Δ mtr2-33* ein additiver Defekt beim Export der prä-60S-Untereinheit auftritt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Npl3p im *BY*-Stammhintergrund keinen unmittelbaren Einfluss auf die Synthese bzw. Prozessierung der rRNA aufweist. Im Gegensatz dazu ist ersichtlich, dass Npl3p direkt am Export der prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma beteiligt ist.

5.2.2 Npl3p fungiert unabhängig von Mex67p-Mtr2p und Nmd3p-Xpo1p beim Export der ribosomalen prä-60S-Untereinheit

Npl3p fungiert beim mRNA-Export als Adapter für das Exportrezeptorheterodimer Mex67p-Mtr2p (Lai und Tarn, 2004). Im Gegensatz dazu weist Npl3p beim Transport der prä-60S-Untereinheit keine Adapterfunktion für Mex67p-Mtr2p auf, da die Assoziation von Mex67p mit der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* vergleichbar zu der in Wildtyp ist (Abb. 24). Kürzlich wurde eine direkte Assoziation von Mex67p mit der rRNA nachgewiesen (Yao *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2008). Dies unterstützt ein Modell, in dem Npl3p eine Mex67p-unabhängige Rezeptorfunktion beim Export der prä-60S-Untereinheit besitzt. Des Weiteren fungiert Npl3p nicht als Adapterprotein für das Exportrezeptorheterodimer Nmd3p-Xpo1p (Daten von Alexandra Hackmann, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung), was zusätzlich auf eine unabhängige Exportfunktion von Npl3p hindeutet. In temperatursensitiven *npl3*-Mutanten erfolgt bereits nach einer kurzen Inkubation bei 37°C eine schnell auftretende nukleäre Akkumulation der prä-60S-Untereinheit (Abb. 19A). Demzufolge besitzt Npl3p, obwohl es nicht als Adapterprotein für die beiden Heterodimere Nmd3p-Xpo1p und Mex67p-Mtr2p fungiert, wahrscheinlich eine aktive Funktion beim Export der prä-60S-Untereinheit.

Da die prä-60S-Untereinheit eines der größten Transportsubstrate für den Translokationsprozess durch den NPC darstellt, werden zahlreiche Rezeptoren, wie Nmd3p-Xpo1p, Mex67p-Mtr2p bzw. Arx1p, für den Export benötigt. Interessanterweise erfordert der Transport der prä-60S-Untereinheit keine spezifischen Rezeptoren, was auf eine gewisse Flexibilität der Exportfaktoren bei dem Transportvorgang hindeutet (Lo und Johnson, 2009). Ähnlich ist in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Überexpression von *MTR2* bzw. *NMD3* in *npl3Δ* den defekten Export der prä-60S-Untereinheit vollständig auf Wildtypniveau supprimiert (Abb. 26A), so dass der Verlust von Npl3p durch Bereitstellung anderer Exportfaktoren ausgeglichen werden kann. In den Exportmutanten *mtr2-33* und *nmd3-2* misslokalisiert neben der prä-60S-Untereinheit ebenfalls Npl3p im Zellkern (Abb. 18 und Abb. 20). Demnach befinden sich Npl3p, Mtr2p und Nmd3p auf dem gleichen RNP, obwohl diese Exportfaktoren anscheinend unabhängig voneinander agieren (Lo und Johnson, 2009). Dies verdeutlicht, dass aufgrund der extremen Größe der prä-60S-Untereinheit für dessen Transport durch den NPC eine große Anzahl an Transportrezeptoren benötigt wird. Demzufolge könnte Npl3p unabhängig von den bislang beschriebenen Exportfaktoren als neuer Exportfaktor aktiv am Transport der prä-60S-

Untereinheit in das Zytoplasma beteiligt sein, um dessen effizienten Export zu gewährleisten.

Jedoch ist derzeit unklar, wie Npl3p diesen Translokationsprozess durch den NPC vermittelt. Für den Export der mRNA wird zusätzlich Sac3p benötigt, welches am NPC lokalisiert ist und mit dem Npl3p-assoziierten Heterodimer Mex67p-Mtr2p beim Export des mRNP's wechselwirkt (Fischer *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2003; Chekanova *et al.*, 2008). Daher wäre es denkbar, dass der Kontakt mit dem NPC über die Interaktion von Npl3p mit Sac3p erfolgt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *sac3Δ* ebenso wie *npl3Δ* Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit aufweist (Abb. 25). Daher ist es vorstellbar, dass Npl3p direkt den Translokationsprozess der prä-60S-Untereinheit mit Hilfe von Sac3p unterstützt. Zusätzlich akkumuliert Mex67p in *sac3Δ* an der Zellkernmembran (Lei *et al.*, 2003). Demzufolge ist es genauso möglich, dass Mex67p den Sac3p-vermittelten Export der prä-60S-Untereinheit sowie die Wechselwirkung mit den Nukleoporen gewährleistet (Strasser *et al.*, 2000; Strawn *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2002).

5.3 Npl3p unterstützt den *Subunit Joining* Prozess während der Translation

Da die Überexpression von *MTR2* oder *NMD3* zu einer vollständigen Suppression der Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit führt (Abb. 24A), ist die Funktion von Npl3p beim Export der prä-60S-Untereinheit im *BY*-Stammbhintergrund ähnlich dem Transport der mRNP's nicht essentiell. Im Gegensatz dazu werden in *npl3Δ* durch die Überexpression von *MTR2* oder *NMD3* weder die Wachstumsdefekte vollständig supprimiert (Abb. 26B) noch die Translationsdefekte aufgehoben (Abb. 27). Dies legt nahe, dass Npl3p mindestens eine zusätzliche Funktion während der Translation aufweist. Tatsächlich wurde in *npl3Δ* mit Hilfe der spezifischen Suppression der Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit ein Defekt in der Bildung des Monosoms, dem *Subunit Joining*, nachgewiesen (Abb. 32 und Abb. 33). Bei dem Prozess des *Subunit Joinings* assoziieren die 40S- und die 60S-Untereinheit zu einem funktionellen 80S-Ribosom (Monosom).

Nach dem Transport der prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma erfolgen weitere Prozessierungsschritte, bis die vollständig funktionsfähige 60S-Untereinheit entstanden ist (Zemp und Kutay, 2007). So könnten zytoplasmatische Prozessierungsdefekte die Translation und damit ebenfalls den *Subunit Joining* Prozess beeinträchtigen. Bei einem der zytoplasmatischen Prozessierungsschritte assoziiert das ribosomale Protein Rpl10p, welches an das Chaperon Sgt1p gebunden ist, mit Hilfe der GTPase Lsg1p mit der

prä-60S-Untereinheit (Eisinger *et al.*, 1997; Gadai *et al.*, 2001; Kallstrom *et al.*, 2003; Pachler *et al.*, 2004). Dabei erfolgt die gleichzeitige Dissoziation von Nmd3p von der prä-60S-Untereinheit (Hedges *et al.*, 2005; West *et al.*, 2005; Hedges *et al.*, 2006). Allerdings ist die Rekrutierung von Rpl10p an die prä-60S-Untereinheit durch die Deletion von *NPL3* unbeeinflusst (Abb. 31). Obwohl *NPL3* mit *LSG1*, ähnlich wie mit *RPL10* und *FUN12*, genetisch interagiert (Abb. 29), werden durch die Überexpression von *NPL3* ausschließlich die Wachstumsdefekte von den *Subunit Joining* Mutanten *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* supprimiert (Abb. 30). Da die Expression von *NPL3* in Hefezellen hoch reguliert ist, wirkt dessen Überexpression toxisch auf das Wachstum (Flach *et al.*, 1994; Sopko *et al.*, 2006; Lund *et al.*, 2008). Demnach überwiegen die durch die Überexpression von *NPL3* erzielten Wachstumsvorteile in den *Subunit Joining* Mutanten der toxischen Wirkung. Zusammenfassend kann somit ausgeschlossen werden, dass Npl3p an dem finalen zytoplasmatischen Reifungsschritt der prä-60S-Untereinheit zur 60S-Untereinheit beteiligt ist. Stattdessen weisen die spezifischen Suppressionen der Wachstumsdefekte von *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* auf eine weitere Funktion von Npl3p direkt beim *Subunit Joining* hin.

Interessanterweise erfolgt durch die Überexpression von *MTR2* bzw. *NMD3* keine Suppression des Wachstumsdefekts von *fun12Δ* (Abb. 30). Zum einen verdeutlicht dies, dass die Überexpression von Exportfaktoren der prä-60S-Untereinheit nicht unmittelbar zu einer Suppression der Wachstumsdefekte in *Subunit Joining* Mutanten führt. Zum anderen wird ersichtlich, dass eine Bereitstellung einer erhöhten Anzahl an 60S-Untereinheiten im Zytoplasma nicht zu einem verbesserten *Subunit Joining* führt. Zusätzlich deuten die synthetischen Letalitäten von *npl3Δ* mit den *Subunit Joining* Mutanten *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* (Abb. 29) auf eine spezifische Funktion von Npl3p im *Subunit Joining* Prozess. Darüber hinaus zeigen *MTR2*, *NMD3* und *XPO1* im Gegensatz zu *NPL3* keine genetischen Interaktionen mit *FUN12* (Abb. 29). Demzufolge sind die Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit in *npl3Δ* nicht die Ursache für die genetischen Interaktionen mit den *Subunit Joining* Faktoren, da ansonsten die Kombinationen von Export- und *Subunit Joining* Mutanten ebenfalls zu Wachstumsdefekten führen sollten.

Neben einer verringerten Menge an 80S-Ribosomen ist in *npl3Δ* die Menge der freien, nicht mRNA-gebundenen ribosomalen Untereinheiten im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (Abb. 32B). Interessanterweise wird durch die Überexpression von *NPL3* in den *Subunit Joining* Mutanten, *rpl10(G161D)* und *fun12Δ*, nicht nur deren Wachstumsdefekt, sondern auch zum Teil deren Defekt in der Monosomenbildung

supprimiert (Abb. 30, Abb. 34 und Daten nicht gezeigt). Die erhöhte Bildung der 80S-Ribosomen führt vermutlich zu einer effizienteren Translation, die das verbesserte Wachstum in den *Subunit Joining* Mutanten erklärt. Daher legen diese Ergebnisse eine Funktion von Npl3p beim *Subunit Joining* nahe, in dem es unterstützend auf die Bildung der Monosomen wirken könnte.

Im Gegensatz zu *fun12Δ* führt die Deletion von *NPL3* zu keiner erhöhten Bildung von nicht mit mRNA assoziierten 80S-Ribosomen, den so genannten *80S-Couples* (Abb. 34 und Daten nicht gezeigt) (Sutrave *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 1998). Darüber hinaus erfolgt durch die Überexpression von *NPL3* in *fun12Δ* ebenso unter Bedingungen, bei denen die *80S-Couples* dissoziieren, eine Suppression der defekten Monosomenbildung (Abb. 34). Demzufolge hat Npl3p keinen Einfluss auf die Bildung von *80S-Couples*, stattdessen ist es im mRNA-abhängigen *Subunit Joining* Prozess involviert.

5.3.1 Npl3p unterstützt den *Subunit Joining* Prozess durch Homodimerisierung

Nachdem Npl3p die mRNA in das Zytoplasma transportiert hat, assoziiert die 40S-Untereinheit beim Prozess des *Scannings* mit der Npl3p-assoziierten mRNA, um das Start-Kodon zu finden. Die in dieser Arbeit gezeigte, neue Adapterfunktion von Npl3p beim Export der prä-60S-Untereinheit und die Tatsache, dass Npl3p *in vivo* Homodimere ausbilden kann (Yu *et al.*, 2004; McBride *et al.*, 2005) legt ein Modell nahe, bei dem Npl3p beide ribosomalen Untereinheiten im Zytoplasma beim *Subunit Joining* über Homodimerisierung zusammenführen könnte (Abb. 65). Npl3p assoziiert *in vitro* direkt mit sich selbst (Abb. 35), so dass an dieser Homodimerisierung keine Bindeproteine involviert sind. Diese spezifische Homodimerisierung erfolgt über eine kurze carboxyterminale Domäne von Npl3p im Aminosäurebereich 276-365 (Daten von Claudia Baierlein, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung und Abb. 37A). Diese Region ist für die vollständige Homodimerisierungsaktivität notwendig. Jedoch ist der Aminosäurebereich 276-340 für die Homodimerisierung ausreichend, wenn auch die Fähigkeit von Npl3p, Homodimere auszubilden, beeinträchtigt ist.

Interessanterweise kann homodimerisierungsfähiges Npl3p zum einen die Wachstumsdefekte, zum anderen die Translationsdefekte in *npl3Δ* des *BY*- und des *S288C*-Stammhintergrundes supprimieren (Abb. 37B, Abb. 38 und Abb. 40A). Daher ist die Homodimerisierung von Npl3p für dessen Funktionen bei der Translation erforderlich. Da

die beiden RRM's durch die Deletion der Homodimerisierungsdomäne erhalten bleiben, sind die Deletionen von *NPL3* noch immer in der Lage, RNA zu binden. Erstaunlicherweise führen die carboxyterminalen, nicht homodimerisierungsfähigen Deletionen von *NPL3* sowohl im *BY*- als auch im *S288C*-Stammhintergrund weder zu mRNA-Exportdefekte noch zu einem reduzierten Transport der prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma (Abb. 39, Abb. 40B und Daten nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass die für den Export beider RNP's benötigten Funktionen nicht über die Homodimerisierungsdomäne von Npl3p vermittelt werden. Stattdessen ist diese Domäne Npl3p für eine effiziente Translationsinitiation beim *Subunit Joining* und für den Re-Import von Npl3p notwendig.

Weitere Untersuchungen der Funktion der carboxyterminalen Domäne zeigen, dass eine Überexpression dieser, *npl3-C*, ebenso wie eine Deletion zu Wachstumsdefekten führt (Abb. 42). Dieses reduzierte Wachstum bei einer Überexpression von *npl3-C* wird nicht durch mRNA-Exportdefekte verursacht (Abb. 43), da *npl3p-C* nicht mit mRNA assoziieren und dessen Transport beeinflussen kann. Stattdessen wird es durch Translationsdefekte (Abb. 44) aufgrund des verringerten *Subunit Joinings* hervorgerufen (Abb. 45). Im Gegensatz dazu besitzt die Überexpression der aminoterminalen Domäne von *NPL3*, *npl3-N*, keinen Einfluss auf den *Subunit Joining* Prozess (Abb. 42, Abb. 44 und Abb. 45). Durch das Fehlen der RRM's wird zwar die Interaktion von *npl3p-C* mit der RNA, jedoch nicht dessen Homodimerisierung verhindert (Daten von Claudia Baierlein, AG Krebber; Gross *et al.*, in Vorbereitung). Daher blockiert die Assoziation von nicht-funktionellem *npl3p-C* mit Wildtyp-Npl3p dessen Homodimerisierung. Die Besetzung der Bindestellen mit *npl3p-C* führt zu dominant-negativen Effekten, welche demzufolge die Funktion von Npl3p beim *Subunit Joining* mittels Homodimerisierung unterstützen.

5.3.2 Npl3p interagiert erst beim *Subunit Joining* Prozess mit der ribosomalen 40S-Untereinheit

Da Npl3p als Adapterprotein am Export der prä-60S-Untereinheit beteiligt ist und beim *Subunit Joining* mit der 60S-Untereinheit assoziiert, ist es nicht verwunderlich, dass eine Interaktion von Npl3p auch mit der 40S-Untereinheit nachzuweisen ist (Abb. 36). Diese physikalische Interaktion könnte bei der Bildung des 80S-Ribosoms stattfinden. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass mRNA-assoziiertes Npl3p ebenso beim *Scanning* Prozess, bei dem die 40S-Untereinheit das Start-Kodon auf der mRNA identifiziert, mit der

40S-Untereinheit interagiert. Da *npl3Δ* keine nukleäre Misslokalisierung der prä-40S-Untereinheit aufweist (Abb. 18), ist es jedoch unwahrscheinlich, dass Npl3p bereits im Zellkern oder während dem Transportprozess mit der prä-40S-Untereinheit assoziiert. Darüber hinaus ist in der *Subunit Joining* Mutante *rpl10(G161D)*, die eine reduzierte Monosomenanzahl aufweist, die physikalische Interaktion von Npl3p mit der prä-40S-Untereinheit im Vergleich zum Wildtyp verringert (Abb. 36).

Es ist allerdings unklar, ob Npl3p nach der Translationsinitiation weiterhin mit den RNP's assoziiert oder nach Beendigung des *Subunit Joining* Prozesses von ihnen dissoziiert. Ko-Sedimentationsanalysen zeigen, dass ~30% von Npl3p mit Polysomen assoziiert (Windgassen *et al.*, 2004), so dass dies eher auf eine vorwiegende Funktion bei der initialen Translationsinitiation schließen lässt. Obwohl der Großteil des Proteins nicht mit translatierenden Ribosomen assoziiert, deuten im Gegensatz dazu die starken Translationsdefekte in *npl3Δ* (Abb. 14) auf eine verlängerte Assoziation von zumindest einem kleinen Teil von Npl3p mit der 60S-Untereinheit hin. Demzufolge wäre es denkbar, dass Npl3p nach der Ribosomenfreisetzung an der 60S-Untereinheit verbleibt, um so nachfolgende *Subunit Joining* Ereignisse weiterer mRNA's zu unterstützen. Neben dem Zeitpunkt ist der Mechanismus der Dissoziation von Npl3p von den sich in der Translation befindlichen mRNP's derzeit unklar.

5.4 Npl3p ist ein multifunktionelles Protein

Das mRNA-bindende, pendelnde SR-Protein ist in die Regulation der Transkription involviert und fungiert beim mRNA-Export als Adapter für das Exportrezeptorheterodimer Mex67p-Mtr2p (Gilbert und Guthrie, 2004). Die Assoziation von Npl3p spezifisch mit hoch-exprimierten Transkripten, z.B. mit mRNA's die für ribosomale Proteine kodieren (Kim Guisbert *et al.*, 2005) legt nahe, dass die Translationseffizienz von einem Großteil der mRNA's durch Npl3p regulatorisch beeinflusst wird. In dieser Arbeit wurde Npl3p zunächst als ein neuer Exportfaktor der prä-60S-Untereinheit charakterisiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Npl3p beim *Subunit Joining* Prozess hilft, in dem es stabilisierend auf die Bildung der 80S-Ribosomen wirkt. Darüber hinaus erfordern die Funktionen von Npl3p bei der Translationsinitiation dessen Homodimerisierung.

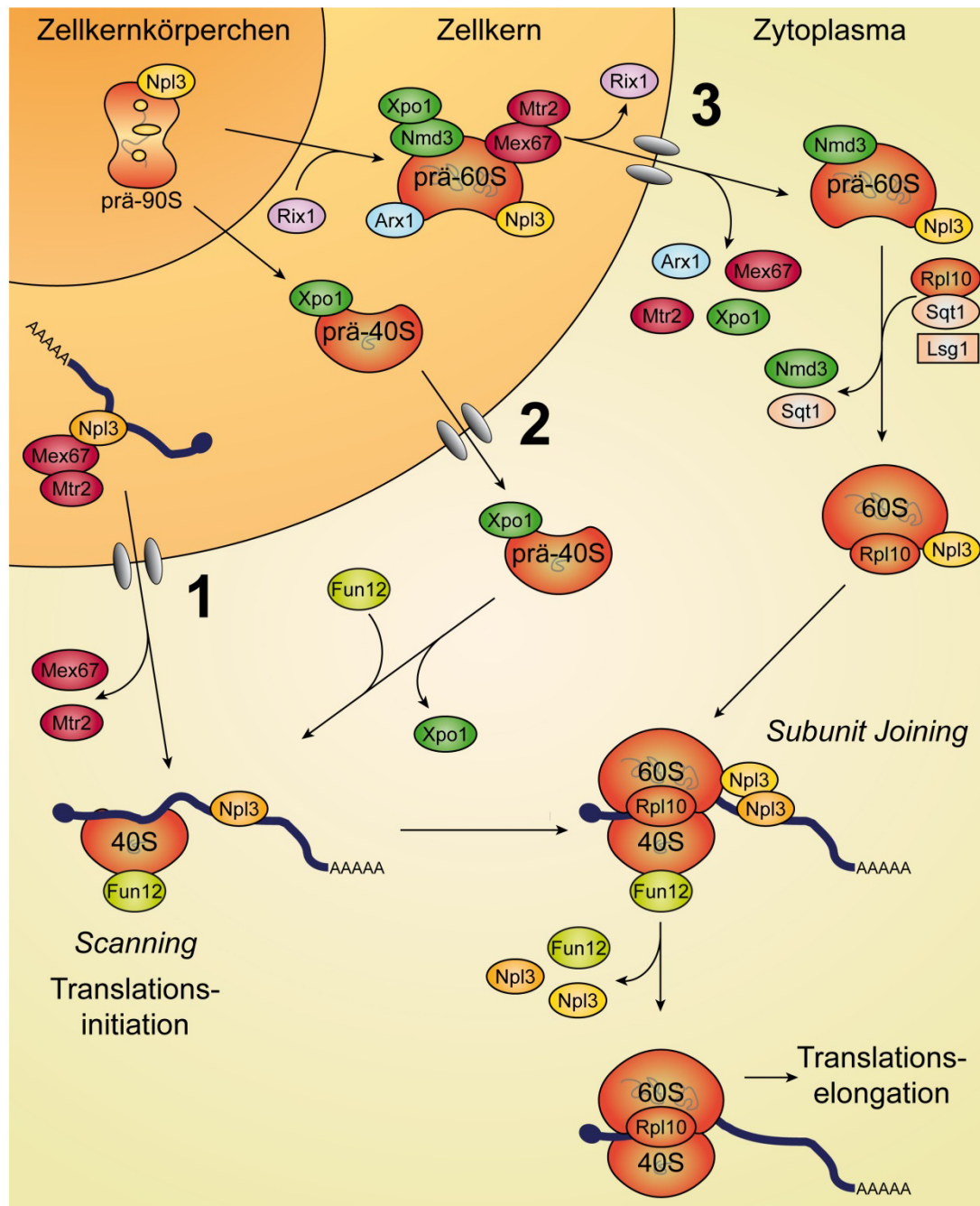


Abbildung 65: Modell für die Funktionen von Npl3p beim RNP-Export und bei der Translation.

Npl3p ist sowohl am Transport der mRNA (1) als auch am Transport der prä-60S-Untereinheit (3) ins Zytoplasma aktiv beteiligt und bleibt bis zur Translation mit beiden RNP's assoziiert. Nach dem Export der prä-40S-Untereinheit durch Xpo1p (2) erfolgt im Zytoplasma zum einen die Dissoziation von Xpo1p und zum anderen nach den zahlreichen Prozessierungen die Rekrutierung der GTPase Fun12p an die 40S-Untereinheit (eIF5B). Anschließend scannt die 40S-Untereinheit die 5'-UTR der mRNA bis zum Start-Kodon. Durch die frühzeitige Assoziation von Npl3p mit dem prä-90S-Ribosom im Zellkernkörperchen wird mit Hilfe weiterer Exportfaktoren, wie Arx1p und den Heterodimeren Xpo1p-Nmd3p bzw. Mex67p-Mtr2p, der Transport der prä-60S-Untereinheit vom Zellkern in das Zytoplasma vermittelt (3). Dagegen ist die Interaktion des Ribosomenbiogenesefaktors Rix1p mit der prä-60S-Untereinheit auf den Zellkern beschränkt. Die Exportfaktoren Xpo1p, Mtr2p, Mex67p und Arx1p mit Ausnahme von Nmd3p dissoziieren nach dem Translokationsprozess im Zytoplasma von der prä-60S-Untereinheit. Anschließend erfolgt die Rekrutierung von Rpl10p an die prä-60S-Untereinheit. Rpl10p liegt zusammen mit dem Chaperon Sqt1p in einem Komplex vor. Außerdem ist die GTPase-Aktivität von Lsg1p erforderlich, denn sie ermöglicht die Dissoziation von Nmd3p. Npl3p bleibt während der zytoplasmatischen Prozessierung mit der 60S-Untereinheit assoziiert, um schließlich beim *Subunit Joining*, bei dem die 40S-Untereinheit und die 60S-Untereinheit assoziieren, die Bildung des 80S-Ribosoms zu unterstützen.

Allerdings bleibt offen, ob die Npl3p-Npl3p-Interaktion einer spezifischen Regulation unterliegt und Npl3p nicht nur homodimerisieren, sondern auch Homooligomere auszubilden kann. Es wäre denkbar, dass die Assoziation über die in der Homodimerisierungsdomäne stattfindenden, posttrans-lationellen Modifikationen, wie Phosphorylierung und Methylierung, reguliert wird.

Zusammenfassend lässt sich aus den in *S. cerevisiae* bekannten Funktionen von Npl3p und den Ergebnissen dieser Arbeit ein Modell ableiten, bei dem der Npl3p-vermittelte Export der beiden RNP's für die zytoplasmatische Funktion von Npl3p beim *Subunit Joining* erforderlich ist (Abb. 65). Über die Homodimerisierung von Npl3p könnte eine Stabilisierung der Assoziation der mRNA-gebundenen 40S-Untereinheit mit der 60S-Untereinheit erfolgen, um so die für die effiziente Translationsinitiation erforderliche Bildung des 80S-Ribosoms zu unterstützen. Demzufolge ist Npl3p nicht nur in zahlreichen Prozessen der Genexpression involviert ist, sondern verbindet diese aktiv miteinander.

Die Multifunktionalität von Npl3p in *S. cerevisiae* stellt nur ein Beispiel für die hohe Effizienz der eukaryontischen Genexpression dar. Vermutlich haben weitere mRNA-Exportfaktoren Funktionen in der Translation. Tatsächlich weisen die beiden SR-Proteine Gbp2p und Hrb1p in *S. cerevisiae* ähnlich zu Npl3p eine Ko-Sedimentation mit Polysomen auf (Windgassen *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das pendelnde humane Homolog von Npl3p, SF2/ASF, nicht nur beim Spleißprozess bzw. beim Transport der mRNA's von Bedeutung ist, sondern mit Polysomen assoziiert und stimulierend auf den Translationsprozess wirkt (Sanford *et al.*, 2004). Diese stimulierende Funktion von SF2/ASF erfolgt über Suppression der Aktivität des eIF4E-bindenden Proteins 4E-BP (Michlewski *et al.*, 2008). Interessanterweise können in *S. cerevisiae* die Wachstumsdefekte der eIF4E-Mutante *cdc33-1* ebenfalls durch die Überexpression von *NPL3* supprimiert werden (Abb. 29). Allerdings bleibt offen, ob Npl3p zusätzlich zum *Subunit Joining* auch bei der Regulation von eIF4E in *S. cerevisiae* ähnliche Funktionen wie SF2/ASF beim Menschen besitzt. Es ist ebenso unklar, ob SF2/ASF zu Npl3p vergleichbare Funktionen, wie die beim Export der prä-60S-Untereinheit oder beim *Subunit Joining*, aufweist.

5.5 Der mRNA-Exportfaktor Dbp5p hat eine zusätzliche Funktion in der Translationstermination

Die mRNA-Exportfunktion von der DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p war bereits zu Beginn dieser Arbeit bekannt und durch zahlreiche Studien charakterisiert. So wurde in den ersten Studien gezeigt, dass Dbp5p zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelt und Mutanten von *DBP5* Defekte beim mRNA-Export aufweisen (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1998) (Abb. 46 und Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von Dbp5p an die prä-mRNA frühzeitig mit Hilfe der carboxyterminalen Domäne der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II des Transkriptionsfaktors IIH erfolgt, wodurch Dbp5p regulierend auf die Transkription wirken kann (Estruch und Cole, 2003).

Neben der überwiegend zytoplasmatischen Lokalisation weist Dbp5p eine hohe Anreicherung entlang der Zellkernmembran auf, wobei letztere die Assoziation von Dbp5p mit Proteinen des NPC's erklärt (Hodge *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 1999; Strahm *et al.*, 1999). Die NPC-assoziierte Lokalisation von Dbp5p weist außerdem auf dessen Funktion beim mRNA-Export hin. Es wird angenommen, dass die katalytische Aktivität der DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p den Translokationsprozess der mRNA ermöglicht und für zahlreiche Umstrukturierungen des mRNP's während den finalen Schritten des mRNA-Exports notwendig ist. So wurde bereits gezeigt, dass die Dissoziation von Proteinen, wie dem Exportrezeptorheterodimer Mex67p-Mtr2p oder Nab2p, von der mRNA von Dbp5p abhängig ist (Lund und Guthrie, 2005; Tran *et al.*, 2007). Bei diesen Prozessen stimuliert Gle1p zusammen mit dem kleinen Signalmolekül Inositolhexakisphosphat (InsP₆) die RNA-abhängige ATPase-Aktivität von Dbp5p, die für die Funktionen beim Transport sowie vermutlich bei der Dissoziation des mRNP's vom NPC benötigt wird (Hodge *et al.*, 1999; Strahm *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2004; Alcazar-Roman *et al.*, 2006; Weirich *et al.*, 2006).

Interessanterweise wurde für Dbp5p eine Funktion bei der Translation postuliert, da Dbp5p eine Ko-Sedimentation mit Polysomen aufweist (Daten von Merle Windgassen, AG Krebber; Gross *et al.*, 2007). Zusätzlich weisen *dbp5*-Mutanten schwache Translationsdefekte auf, die nicht durch mRNA-Exportdefekte oder Defekte im Spleißprozess verursacht werden (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1998) (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist die verringerte Translationsrate nicht mit den starken Translationsdefekten vergleichbar, die in Mutanten von Translationsinitiationsfaktoren auftreten, wie *PRT1* (eIF3) oder den beiden DEAD-Box RNA-Helikasen *TIFI* (eIF4A) bzw. *DED1* (Linder und

Slonimski, 1988; Phan *et al.*, 1998; Iost *et al.*, 1999). Obgleich Dbp5p nicht nur an der Zellkernmembran angereicht vorliegt, sondern ein Großteil des Proteins auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1998), wurde eine mögliche zytoplasmatische Funktion von Dbp5p bisher noch nicht genauer untersucht. Eine etwaige Funktion von Dbp5p bei der Translation wird dadurch unterstützt, dass das Wachstum von *dbp5*-Mutanten durch die Anwesenheit von Translationsinhibitoren negativ beeinflusst wird (Abb. 47). Interessanterweise weist die Nukleoporinmutante *rat7-1*, welche stärkere mRNA-Exportdefekte als die *dbp5*-Mutanten besitzt, in Anwesenheit der Translationsinhibitoren ein zu Wildtyp vergleichbares Wachstum auf (Abb. 46 und Abb. 47). Demzufolge wird die Sensitivität der *dbp5*-Mutanten gegenüber Translationsinhibitoren ebenso wie die Translationsdefekte nicht durch deren auftretenden mRNA-Exportdefekte hervorgerufen.

Die Funktion von Dbp5p während der Translation wurde in der vorliegenden Arbeit mittels verschiedener genetischer Untersuchungen eingegrenzt. *DBP5* interagiert genetisch mit den Translationsfaktoren *SUP45* (eRF1), *SUP35* (eRF3) und *PAB1*, die gemeinsam in dem Prozess der Translationstermination involviert sind (Tab. 20, Abb. 48, und Abb. 50). Die Translationstermination erfolgt durch die Erkennung des Stopp-Kodons durch Sup45p (eRF1), das zusätzlich die hydrolytische Spaltung der letzten Aminosäure von der tRNA katalysiert, wodurch die Abspaltung der Polypeptidkette vom Ribosom erfolgt. Bei diesem Prozess wird die Aktivität des Terminationsfaktors mit Hilfe der GTPase-Aktivität von Sup35p (eRF3) stimuliert (Salas-Marco und Bedwell, 2004; Jacobson, 2005; Fan-Minogue *et al.*, 2008). Zusätzlich erfolgt über Sup35p (eRF3) die Interaktion des Terminationskomplexes mit Pab1p (Cosson *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004). Diese könnte eine unterstützende Funktion beim postulierten Recycling-Prozess besitzen, bei dem die Umsetzung der terminierten Ribosomen an den 5'-UTR der mRNA erfolgt (Uchida *et al.*, 2002; Rajkowitsch *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass das Recycling von Ribosomen eine effizientere Initiation ermöglicht. Aufgrund der genetischen Interaktionen von *DBP5* mit den Translationsterminationsfaktoren wurde eine mögliche Funktion von Dbp5p bei der Termination erkennbar. Darüber hinaus wird diese mit Hilfe der dualen Luziferase-reporterversuchen ersichtlich, da *dbp5*-Mutanten spezifisch Defekte bei der Erkennung des Stopp-Kodons aufweisen (Abb. 53). Im Gegensatz dazu trägt Dbp5p weder zur Auflösung von Sekundärstrukturen bei, noch besitzt es einen Einfluss auf die Genauigkeit der Leserahmenerkennung (Abb. 53).

Das Ribosomenprofil von *dbp5*-Mutanten zeigt nicht nur eine erhöhte Anzahl an 80S-Ribosomen, sondern auch eine reduzierte Menge an Polysomen (Daten nicht gezeigt). Obwohl dieses charakteristische Ribosomenprofil ein Merkmal für Translationsinitiationsmutanten ist, wurde bereits gezeigt, dass die Depletion von humanem eRF3 ebenfalls zu diesem typischen Ribosomenprofil führt (Chauvin *et al.*, 2007). Zusätzlich wurden bislang weder genetische noch physikalische Interaktionen von *DBP5*/Dbp5p mit Translationsinitiationsfaktoren oder -elongationsfaktoren nachgewiesen (Tab. 20 und Abb. 49) (Bolger *et al.*, 2008). Interessanterweise erfolgt ebenfalls eine Ko-Sedimentation von mutiertem dbp5p mit Polysomen (Abb. 63), so dass die Translationsinitiation wahrscheinlich unabhängig von Dbp5p erfolgen kann. Darüber hinaus wird durch die Depletion von Dbp5p die *in vitro* Proteinbiosynthese nicht beeinflusst (Tseng *et al.*, 1998). Demzufolge ist anhand dieser Ergebnisse eine direkte Funktion von Dbp5p an den frühen Prozessen der Translation, Initiation oder Elongation, unwahrscheinlich und eine Spezifität für die Translationstermination ersichtlich.

5.5.1 Dbp5p reguliert die Interaktion der beiden Translations-terminationsfaktoren Sup45p und Sup35p

Die direkte, mRNA-unabhängige physikalische Interaktion von Dbp5p mit Sup45p (eRF1) sowie deren Ko-Sedimentation mit Polysomen zeigt die gleichzeitige Präsenz des Terminationsfaktors und der DEAD-Box RNA-Helikase an den Ribosomen (Abb. 60, Abb. 61 und Abb. 63). Allerdings ist unklar, ob die Assoziation von Sup45p (eRF1) mit Dbp5p direkt oder indirekt über das 80S-Ribosom vermittelt wird. Erstaunlicherweise erfolgt im Gegensatz zu Sup45p (eRF1) keine physikalische Interaktion von Sup35p (eRF3) mit Dbp5p (Abb. 60 und Abb. 61), so dass eine gleichzeitige Präsenz der drei Proteine Dbp5p, Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) im Terminationskomplex ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich ist anzumerken, dass Hefestämme mit einer ausschließlichen Expression eines mit einem Anhang (GFP, myc, TAP) versehenen essentiellen Genes *DBP5*, *SUP45* (eRF1) bzw. *SUP35* (eRF3) ein zu Wildtyp vergleichbares Wachstum zeigen (Abb. 62). Demzufolge wird die nicht detektierbare Interaktion von Sup35p (eRF3) mit Dbp5p durch die in den Ko-IP's verwendeten Fusionsproteine weder verhindert, noch inhibiert. Dies legt nahe, dass eine koordinierte Assoziation der drei Proteine mit dem 80S-Ribosom zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt und Dbp5p und Sup35p (eRF3) nicht gleichzeitig mit dem 80S-Ribosom assoziieren.

Interessanterweise führt mutiertes *dbp5p* zu einer verringerten Assoziation von Sup35p (eRF3) mit Polysomen, da die Rekrutierung von Sup35p (eRF3) in den Terminationskomplex in *dbp5*-Mutanten verhindert wird (Abb. 63). Dies legt nahe, dass die beiden Terminationsfaktoren Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) in *dbp5*-Mutanten nicht mehr interagieren können. Tatsächlich ist in *rat8-2 (dbp5)* und *rat8-3 (dbp5)* keine Interaktion von Sup45p (eRF1) mit Sup35p (eRF3) nachweisbar (Abb. 64), so dass die Blockierung der Rekrutierung von Sup35p (eRF3) an die Ribosomen in *dbp5*-Mutanten erneut bestätigt wird. Demzufolge besitzt Dbp5p eine regulatorische Funktion für die Assoziation beider Terminationsfaktoren.

Bei der Translationstermination assoziieren die beiden Proteine Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) direkt miteinander (Stansfield *et al.*, 1995; Inge-Vechtomov *et al.*, 2003), um zusammen die Translationstermination zu vermitteln. Demzufolge interagieren Dbp5p und Sup45p (eRF1) vor dem eigentlichen Terminationsprozess am 80S-Ribosom, so dass folgendes Modell postuliert werden kann (Abb. 66). Nachdem das Ribosom das Stopp-Kodon erreicht hat, erfolgt die Dbp5p-unabhängige Rekrutierung von Sup45p (eRF1). Allerdings ist unklar, zu welchem Zeitpunkt Dbp5p mit dem 80S-Ribosom assoziiert. Die anschließende Dissoziation von Dbp5p ermöglicht die Rekrutierung von Sup35p (eRF3) an Sup45p (eRF1) und das 80S-Ribosom.

Die beiden Translationsterminationsfaktoren Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) unterliegen einer ständigen, strengen Kontrolle. So hat die Regulation der Proteinmenge von Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) einen Einfluss auf die Translationstermination (Dagkessamanskaya *et al.*, 1997; Fan-Minogue *et al.*, 2008). Des Weiteren können die Aktivitäten beider Proteine über posttranslationelle Modifikationen reguliert werden (von der Haar und Tuite, 2007). Allerdings erfolgt über diese regulatorisch wirkenden Prozesse keine unmittelbare Modulation der Translationstermination. Im Gegensatz dazu stellt die Kontrolle der Interaktion beider Terminationsfaktoren durch Dbp5p über die Rekrutierung von Sup35p (eRF3) in den Terminationskomplex eine unmittelbare Regulationsmöglichkeit der Translationstermination dar.

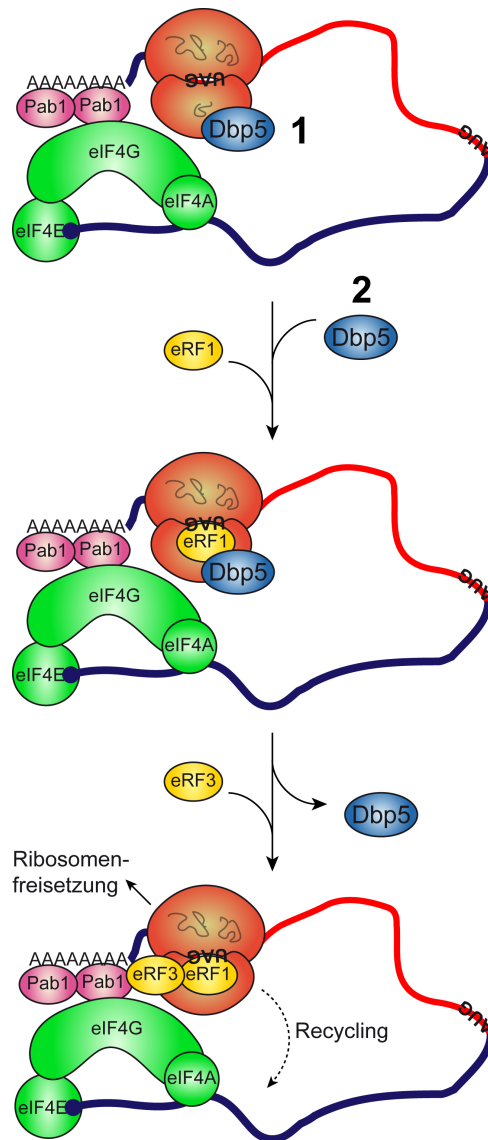


Abbildung 66: Erstes Modell der Funktionsweise von Dbp5p bei der Translationstermination.

Nachdem das 80S-Ribosom das Stopp-Kodon der mRNA erreicht hat, wird Sup45p (eRF1) unabhängig durch Dbp5p an dieses rekrutiert. Dbp5p selbst könnte bereits während der Translation mit dem 80S-Ribosom assoziieren (1). Unabhängig des Zeitpunktes der Assoziation von Dbp5p mit dem 80S-Ribosom erfolgt diese vor dem eigentlichen Terminationsprozess bzw. der Assoziation von Sup45p (eRF1) mit dem 80S-Ribosom (2). Die Interaktion von Dbp5p mit Sup45p (eRF1) sowie die katalytische Aktivität von Dbp5p stimulieren die effiziente Erkennung des Stopp-Kodons, möglicherweise durch Unterstützung der optimalen Positionierung von Sup45p (eRF1). Anschließend erfolgt die Dissoziation von Dbp5p von dem 80S-Ribosom, das die nachfolgende Rekrutierung von Sup35p (eRF3) in den Terminationskomplex ermöglicht. Sup35p (eRF3) stimuliert nicht nur die Freisetzung des synthetisierten Proteins, sondern könnte zusätzlich über die Interaktion mit Pab1p die postulierte Umsetzung des Ribosoms auf dem 5'-UTR der mRNA mit Hilfe des eIF4F-Komplexes (eIF4A, eIF4E und eIF4G) unterstützen.

5.5.2 Die katalytische Aktivität von Dbp5p wird für die Translations-termination benötigt

Die reduzierte Assoziation von Sup35p (eRF3) mit Polysomen (Abb. 63) könnte die nicht detektierbare physikalische Interaktion von Dbp5p mit Sup35p (eRF3) erklären, da Dbp5p vermutlich vom Terminationskomplex am 80S-Ribosom dissoziieren muss, damit Sup35p

(eRF3) mit Sup45p (eRF1) wechselwirken kann. Die Interaktion von Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) beim Terminationsprozess erfolgt über deren carboxyterminalen Domänen (Hoshino *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 1998; Ebihara und Nakamura, 1999; Merkulova *et al.*, 1999). Demzufolge könnte Dbp5p direkt mit der carboxyterminalen Domäne von Sup45p (eRF1) assoziieren, um die Interaktion von Sup35p (eRF3) und Sup45p (eRF1) zu blockieren. Alternativ könnte die für die Translationstermination benötigte katalytische Aktivität von Dbp5p (Abb. 54) erforderlich sein, um die carboxyterminale Bindedomäne von Sup45p (eRF1) für die Assoziation mit Sup35p (eRF3) zugänglich zu machen. Da katalytisch inaktives Dbp5p, dbp5(E240Q)p, mit Polysomen ko-sedimentiert (Abb. 55), kann die katalytische Aktivität von Dbp5p nicht für seine Assoziation mit Polysomen benötigt werden. Dem gegenüber ist die katalytische Aktivität von Dbp5p sowohl für die effiziente Translationstermination, als auch für den mRNA-Export notwendig, da durch eine Überexpression von katalytisch inaktivem *dbp5(E240Q)* keine Suppression der Terminationsdefekte in *sup45-2* erfolgt (Abb. 56). Dies legt nahe, dass die katalytische Aktivität von Dbp5p für die Rekrutierung von Sup35p (eRF3) an Sup45p (eRF1) benötigt wird.

Da die katalytische Aktivität von Dbp5p selbst nur sehr gering ist, werden beim mRNA-Export Ko-Aktivatoren, wie Gle1p und InsP₆, benötigt, die die Dbp5p-Aktivität um das Hundertfache steigern (Alcazar-Roman *et al.*, 2006; Weirich *et al.*, 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass die RNA-abhängige ATPase-Aktivität von Dbp5p durch Gle1p und InsP₆ stimuliert und reguliert wird. Tatsächlich führen Mutationen in *GLE1* bzw. in Genen, die für die Herstellung von InsP₆ benötigt werden, aufgrund der reduzierten Dbp5p-Aktivität zu mRNA-Exportdefekten (Watkins *et al.*, 1998; York *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die katalytische Aktivität von Dbp5p bei der Translationstermination ähnlich dem mRNA-Export ebenfalls über Gle1p reguliert wird, da Gle1p eine zu Dbp5p vergleichbare Ko-Sedimentation mit Polysomen aufweist und Mutanten von *GLE1* ebenfalls Translationsterminationsdefekte hervorrufen (Bolger *et al.*, 2008; Kutay und Panse, 2008). Dies legt nahe, dass die katalytische Aktivität von Dbp5p, die für eine effiziente Translationstermination benötigt wird, ähnlich wie beim mRNA-Export über Gle1p und InsP₆ stimuliert wird.

5.5.3 Erweiterte Modelle der Funktionsweise von Dbp5p bei der Translationstermination

Eine offene Frage ist der Zeitpunkt der Rekrutierung von Dbp5p an die mRNA und/oder die Ribosomen, um die Funktion bei der Translationstermination zu gewährleisten. Eine Möglichkeit besteht in der Assoziation von zytoplasmatisch lokalisierten Dbp5p während einer frühen Phase der Translation an die mRNA bzw. an die Ribosomen. Die Tatsachen der angereicherten Lokalisation von Dbp5p entlang der Zellkernmembran und der aktiven Funktion beim mRNA-Export offenbaren eine weitere Möglichkeit, bei der Dbp5p nach dem Translokationsprozess des mRNP's an die mRNA rekrutiert wird. Demzufolge könnte es im Zytoplasma während der Translation weiterhin an den mRNP's gebunden bleiben, um den Terminationsprozess zu ermöglichen. Unwahrscheinlich ist der gemeinsame Transport von mRNA-assoziiertem Dbp5p durch den NPC, da ausschließlich durch Mutationen des nicht im mRNA-Export involvierten Exportins Xpo1p, jedoch nicht von mRNA-Export defizienten Mutanten eine nukleäre Akkumulation von Dbp5p erfolgt (Hodge *et al.*, 1999; Takemura *et al.*, 2004). Daher ist es wahrscheinlicher, dass Dbp5p am NPC an die mRNA rekrutiert wird. Allerdings besteht ebenso die Möglichkeit, dass zytoplasmatisch lokalisiertes Dbp5p (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1998) nach dessen Dissoziation von der mRNA erneut an das 80S-Ribosom rekrutiert wird, um so den effizienten Terminationsprozess zu gewährleisten.

Ein Anzeichen für eine langanhaltende Interaktion von Dbp5p mit dem 80S-Ribosom könnte die Anzahl der Moleküle in den Hefezellen darstellen, da Dbp5p im Gegensatz zu dessen ATPase-stimulierenden Ko-Aktivators Gle1p eines der in der Hefezelle am häufigsten vorkommenden Proteine ist (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Darüber hinaus legt die Proteinmenge von Dbp5p mit ~15.000 Molekülen pro Hefezelle, die ungefähr 0,1% der gesamten zellulären Proteinmenge ausmacht, sowie die geringe Proteinmenge von Gle1p mit nur ~1.000 Molekülen pro Hefezelle die Möglichkeit einer transienten und/oder regulierten Interaktion zwischen Dbp5p mit Gle1p nahe. Demzufolge könnte die Rekrutierung von Gle1p an Dbp5p bei der Translationstermination direkt über die DEAD-Box RNA-Helikase selbst erfolgen. Ebenso ist es möglich, dass die Rekrutierung über weitere Translationsfaktoren vermittelt wird, da Gle1p im Gegensatz zu Dbp5p zusätzlich eine Funktion während der Translationsinitiation aufweist (Bolger *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist derzeit unklar, zu welchem Zeitpunkt diese Interaktion erfolgt bzw. ob die Interaktion von Dbp5p mit Gle1p dauerhaft erfolgt. Wahrscheinlicher ist jedoch eine transiente Interaktion, die die Aktivität von Dbp5p spezifisch regulieren könnte.

Aufgrund der postulierten Dissoziation von Dbp5p vom Terminationskomplex stellt sich die Frage, wie Dbp5p die Interaktion von Sup35p (eRF3) und Sup45p (eRF1) reguliert, wenn die Translation einer mRNA durch mehrere Ribosomen gleichzeitig erfolgt. Die nicht detektierbare Interaktion von Dbp5p mit Sup35p (eRF3) legt die Vermutung nahe, dass ausschließlich ein Molekül von Dbp5p mit dem 80S-Ribosom bzw. dem Terminationskomplex assoziiert (Abb. 60 und Abb. 61). Ansonsten müsste aufgrund zahlreicher an der mRNA bzw. am 80S-Ribosom verbleibender Proteine von Dbp5p ebenso nach der Dissoziation eine physikalische Interaktion der DEAD-Box RNA-Helikase mit Sup35p (eRF3) detektiert werden.

Interessanterweise ist die Ko-Sedimentation des Terminationsfaktors Sup45p (eRF1) mit Polysomen in *rat8-2 (dbp5)* im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb. 63). Dies verdeutlicht, dass mutiertes dbp5p keinen Einfluss auf die Assoziation von Sup45p (eRF1) mit den 80S-Ribosomen und die Rekrutierung von Sup45p (eRF1) an das 80S-Ribosom besitzt. Daher müsste der Terminationsprozess ungemindert erfolgen können, auch wenn er aufgrund des Fehlens von Sup35p (eRF3) ineffizienter abläuft. Dies wird zusätzlich in den dualen Luziferasereporterversuchen ersichtlich, da in *dbp5*-Mutanten die Defekte in der Translationstermination im Vergleich zu der eRF1-Mutante *sup45-2* weniger gravierend sind (Abb. 53). Insofern Dbp5p einen Einfluss auf die Rekrutierung von Sup45p (eRF1) besitzen würde, müssten die Defekte bei der Erkennung des Stopp-Kodons in *dbp5*-Mutanten wesentlich stärker sein. Daher scheint der Ablauf der Dbp5p-vermittelten Translationstermination immer über die Dbp5p-unabhängige Rekrutierung von Sup45p (eRF1) zu erfolgen.

Die Tatsache, dass Sup45p (eRF1) unabhängig von der Assoziation mit Sup35p (eRF3) mit dem 80S-Ribosom interagieren kann (Fan-Minogue *et al.*, 2008), erklärt die Ko-Sedimentation von Sup45p (eRF1) mit Polysomen in *dbp5*-Mutanten (Abb. 63) und legt zwei weitere Möglichkeiten der Funktionsweisen von Dbp5p nahe (Abb. 67 und Abb. 68). So könnte Sup45p (eRF1) bereits während der Translation mit dem 80S-Ribosom interagieren und aufgrund der Interaktion mit Dbp5p die vorzeitige Rekrutierung von Sup35p (eRF3) bis zur Erkennung des Stopp-Kodons verhindert werden. Anschließend würde Dbp5p dissoziieren und Sup35p (eRF3) in den Terminationskomplex rekrutiert werden. Möglicherweise ist eine potentielle RNase-sensitive physikalische Interaktion von Sup35p mit weiteren Dbp5p-Molekülen, welche an in der Translation befindlichen 80S-Ribosomen gebunden sind, aufgrund einer zeitlich kurzen Verweildauer des Sup45p (eRF1)-Sup35p (eRF3)-Komplexes an dem 80S-Ribosom nicht nachweisbar.

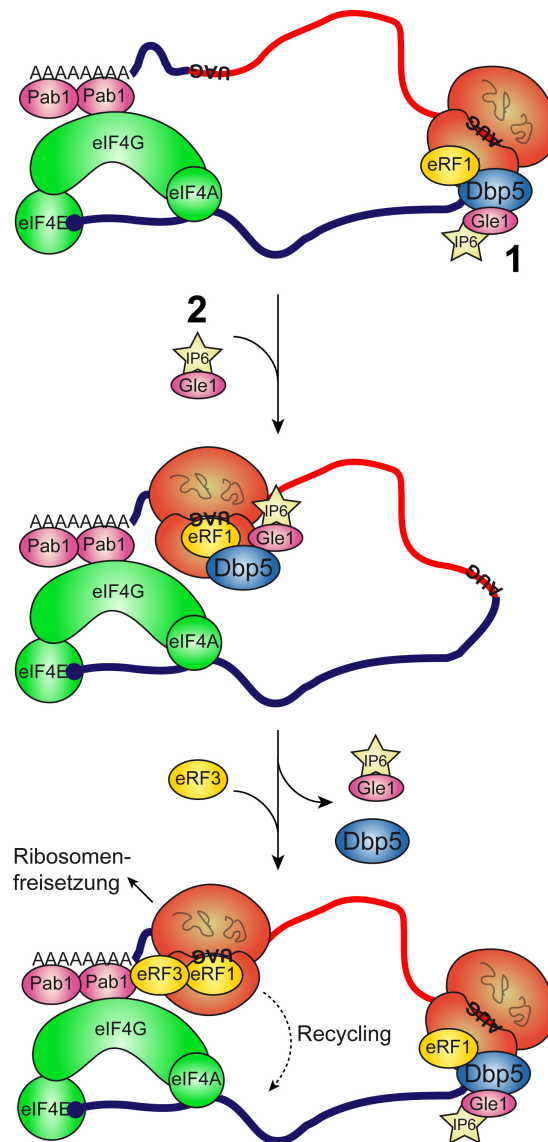


Abbildung 67: Zweites Modell der Funktionsweise von Dbp5p bei der Translationstermination.

Während der Translationsinitiation werden Dbp5p und Sup45p (eRF1), letzteres jedoch unabhängig von Dbp5p, an das 80S-Ribosom rekrutiert. Anschließend erfolgt die Translation in Anwesenheit von Sup45p und Dbp5p, bis das 80S-Ribosom das Stopp-Kodon erreicht. Die Assoziation von Dbp5p mit dessen Ko-Aktivatoren Gle1p und dem Signalmolekül InsP_6 (IP6) könnte entweder bei der Translationsinitiation (1) oder bei der Erkennung des Stopp-Kodons durch Sup45p (eRF1) erfolgen, um zielgerichtet die katalytische Aktivität von Dbp5p zu stimulieren. Die Interaktion von Dbp5p mit Sup45p (eRF1) sowie die katalytische Aktivität von Dbp5p ermöglichen die effiziente Erkennung des Stopp-Kodons, beispielsweise durch Unterstützung der optimalen Positionierung von Sup45p (eRF1). Die nachfolgende Dissoziation von Dbp5p von dem 80S-Ribosom erlaubt die Assoziation von Sup35p (eRF3) an den Terminationskomplex, wodurch nicht nur eine effiziente Translation gewährleistet wird, sondern auch die nachfolgenden Sup35p (eRF3)-vermittelten Ereignisse ermöglicht werden. So stimuliert Sup35p (eRF3) nicht nur die Freisetzung des synthetisierten Proteins, sondern könnte zusätzlich über die Interaktion mit Pab1p die postulierte Umsetzung des Ribosoms auf dem 5'-UTR der mRNA mit Hilfe des eIF4F-Komplexes (eIF4A, eIF4E und eIF4G) unterstützen.

Zusätzlich ist bekannt, dass neben Sup45p (eRF1) auch Sup35p (eRF3) mit 80S-Ribosomen assoziieren kann, welche sich in der Translationsinitiation befinden (Amrani *et al.*, 2008; Fan-Minogue *et al.*, 2008). Demzufolge könnte die frühe und

gleichzeitige Präsenz von Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) im Initiationskomplex des 80S-Ribosoms Voraussetzung für eine effiziente Translation sein.

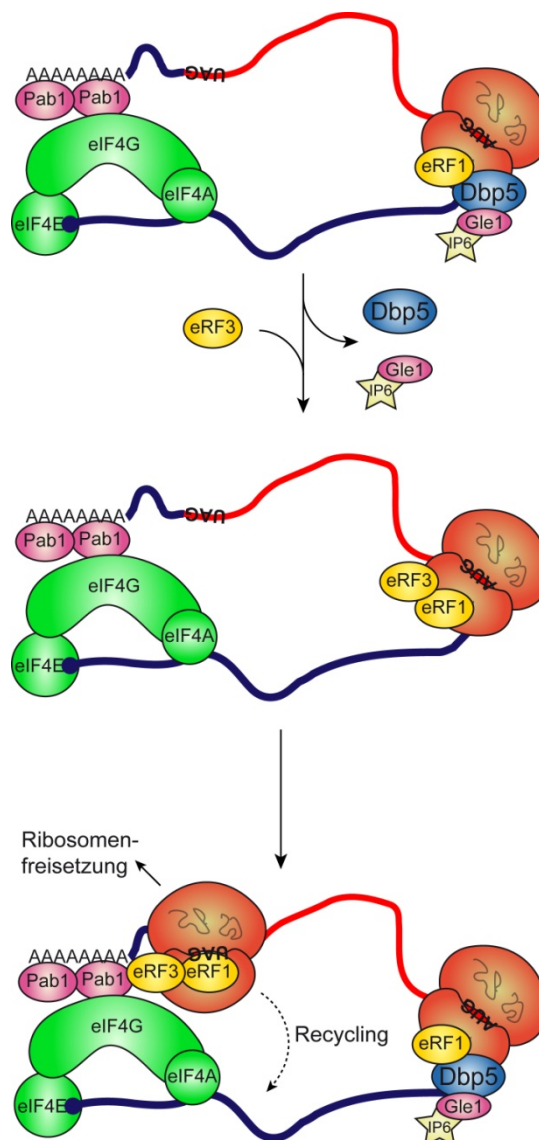


Abbildung 68: Drittes Modell der Funktionsweise von Dbp5p bei der Translationstermination.

Während der Translationsinitiation werden Dbp5p zusammen mit seinen Ko-Aktivatoren Gle1p und dem Signalmolekül InsP_6 (IP6) sowie Sup45p (eRF1), jedoch unabhängig von Dbp5p, an das 80S-Ribosom rekrutiert. Die Interaktion von Dbp5p mit Sup45p (eRF1) sowie die katalytische Aktivität von Dbp5p ermöglichen die nachfolgende Dissoziation von Dbp5p von dem 80S-Ribosom. Dies gewährleistet die Assoziation von Sup35p (eRF3) mit Sup45p (eRF1), wodurch nicht nur eine effiziente Translation bzw. Erkennung des Stopp-Kodons gewährleistet wird, sondern auch die nachfolgenden von Sup35p (eRF3)-abhängigen Ereignisse vermittelt werden. So stimuliert Sup35p (eRF3) bei der Translationstermination nicht nur die Freisetzung des synthetisierten Proteins, sondern könnte zusätzlich über die Interaktion mit Pab1p die postulierte Umsetzung des Ribosoms auf dem 5'-UTR der mRNA mit Hilfe des eIF4F-Komplexes (eIF4A, eIF4E und eIF4G) unterstützen.

Die zusätzliche Tatsache, dass Gle1p Funktionen während der Translationsinitiation aufweist (Bolger *et al.*, 2008), legt ein drittes alternatives Modell zur Erklärung der Funktion von Dbp5p bei der Translationstermination nahe (Abb. 68). Dieses Modell umfasst sowohl die frühe Assoziation von Sup45p (eRF1), als auch die bereits während der

Translationsinitiation stattfindende Dbp5p-abhängige Rekrutierung von Sup35p (eRF3) an das 80S-Ribosom. Dementsprechend könnte Sup35p (eRF3) ebenso wie Dbp5p voraussichtlich vor dem Terminationsprozess mit Sup45p (eRF1) assoziieren. Dafür ist jedoch eine vorausgehende Dissoziation von Dbp5p von Sup45p (eRF1) notwendig. Demnach könnte die Regulation der Interaktion der beiden Terminationsfaktoren Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) durch Dbp5p vor dem Terminationsprozess erfolgen.

5.6 Dbp5p hat keinen Einfluss auf den NMD-Prozess

Nachdem die mRNA in das Zytoplasma exportiert wurde, ermöglichen zum einen die mannigfaltigen Qualitätskontrollen und zum anderen die diversen Signalwege die Regulation der Translation. Diese Prozesse führen zur Unterscheidung von mRNA's, die entweder translatiert werden können oder deren Translation verhindert werden soll. Die Inhibierung der Translation einzelner mRNA's erfolgt beispielsweise bis nach Beendigung des Transports innerhalb des Zytoplasmas. Des Weiteren können mRNA's im Zytoplasma in spezifischen granulären Strukturen (*stress granules*, SG) gelagert werden oder bei Erkennung von PTC's dem NMD-Prozess zugeführt werden (*processing bodies*, P-Bodies) (Sheth und Parker, 2003; Jacobson, 2005; Kedersha *et al.*, 2005; Anderson und Kedersha, 2006; Chang *et al.*, 2007; Kedersha und Anderson, 2007; Parker und Sheth, 2007; Shyu *et al.*, 2008). Beim Menschen grenzen beide Kompartimente aneinander, wohingegen in *S. cerevisiae* die Präsenz von *stress granules* im Gegensatz zu der von P-Körperchen bislang noch nicht nachgewiesen wurde.

Da die Einleitung des NMD-Prozess die Erkennung eines verfrühten Stopp-Kodons (PTC) während der initialen Translationsrunde, der Pionierrunde, erfordert (siehe Einleitung 1.7), besitzen sowohl Sup45p (eRF1) als auch Sup35p (eRF3) im NMD-Prozess ähnlich wie bei der regulären Translationstermination wichtige Funktionen. Sup45p (eRF1) ist zur direkten Erkennung des PTC's notwendig und Sup35p (eRF3) leitet das Signal zur Einleitung des NMD's über die Rekrutierung der Upf-Proteine weiter (Amrani *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004; Amrani *et al.*, 2006; Ivanov *et al.*, 2008). Obwohl gezeigt wurde, dass Dbp5p die Interaktion zwischen Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) kontrolliert, weist Dbp5p erstaunlicherweise keine offensichtliche Funktion beim NMD-Prozess auf. Da die Einleitung des NMD-Prozess in Anwesenheit von Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) während der Pionierrunde und demzufolge vor der eigentlichen Translation erfolgt, wäre eine Beteiligung von Dbp5p zu erwarten gewesen. Jedoch weisen *dbp5*-Mutanten im

Gegensatz zu Hefezellen mit einer Deletion von *UPF1*, die zu einer Stabilisierung von mRNA's mit einem oder mehreren PTC's führt (Leeds *et al.*, 1992; Cui *et al.*, 1995), keine Anreicherung der *pgk1_{N103}*-Reporter-mRNA auf (Abb. 59). Diese *pgk1_{N103}*-Reporter-mRNA ist eine *nonsense* mRNA mit einem PTC im ORF und kann demzufolge in Hefestämmen mit einem defekten NMD-Prozess nicht abgebaut werden. Demnach scheint in *dbp5*-Mutanten erstaunlicherweise der Abbau dieser *nonsense* mRNA zu erfolgen.

Interessanterweise zeigt eine Mutante von *SUP35* (eRF3), *sup35-21*, im Gegensatz zu einer *SUP45* (eRF1)-Mutante, *sup45-2*, keine Anreicherung der *pgk1_{N103}*-Reporter-mRNA. Anzumerken ist, dass *sup35-21* eine stark verringerte Proteinmenge von Sup35p aufweist, wohingegen die Menge von Sup45p unbeeinflusst ist (Daten nicht gezeigt). Demzufolge ist es denkbar, dass der NMD-Prozess ohne Sup35p erfolgen kann und die Dbp5p-vermittelte Rekrutierung von Sup35p (eRF3) in diesem Fall nicht mehr erforderlich ist. Alternativ könnte die Assoziation von Sup45p (eRF1) mit Sup35p (eRF3) beim NMD-Prozess mit Hilfe spezifischer NMD-Faktoren ermöglicht werden.

Zusätzlich zeigen *dbp5-upf*-Doppelmutanten im Vergleich zu den *upf*-Einzelmutanten keine erhöhte Stabilisierung einer Luziferasereporter-mRNA für den NMD-Prozess (Abb. 58). Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, dass das verwendete Reporter-konstrukt kein typisches Substrat für den NMD darstellt. Beim NMD-Prozess wird der Abbau einer *nonsense* mRNA von der Position des PTC's innerhalb des kodierenden Bereichs bestimmt. Befindet sich das PTC in den ersten zwei Dritteln des ORF's, wird der Abbau der mRNA eingeleitet, wohingegen ein PTC im letzten Drittel keinen Einfluss auf den NMD-Prozess besitzt (Zhang *et al.*, 1995). Da das Stopp-Kodon der Luziferasereporter-mRNA sich im zweiten Drittel der mRNA befindet, besteht die Möglichkeit, dass diese mRNA dem NMD dennoch zugeführt wird. Dies legt nahe, dass in *dbp5*-Mutanten der NMD-Prozess funktionsfähig ist und somit Dbp5p keine offensichtliche Funktion im Abbau von mRNA's aufweist bzw. keinen unmittelbaren Einfluss auf diesen besitzt.

Des Weiteren interagieren *DBP5* und *UPF1*, *UPF2* bzw. *UPF3* nicht genetisch miteinander (Abb. 57). Jedoch ist anzumerken, dass die beiden Terminationsfaktoren Sup35p (eRF1) und Sup45p (eRF3) ebenfalls keine genetische Interaktion mit *UPF1* aufweisen. Es bleibt allerdings offen, ob durch kombinierte Deletion von zwei oder drei *UPF*'s zusammen mit einer *dbp5*-Mutation eine genetische Interaktion dieser Gene nachweisbar wäre. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Funktion von Dbp5p beim NMD-Prozess unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu Dbp5p ist die DEAD-Box RNA-Helikase Dhh1p im NMD-Prozess involviert (Tseng-Rogenski *et al.*, 2003; Collier und Parker, 2005; Beckham *et al.*, 2008). Dhh1p stimuliert den *Decapping* Prozess, wodurch Dhh1p regulierend auf den Translationsprozess wirkt (Sheth und Parker, 2003). Zusätzlich können orthologe Proteine von Dhh1p in *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* die Translation von mRNA's reprimieren (Nakamura *et al.*, 2001; Smillie und Sommerville, 2002). Obwohl *DBP5* und *DHH1* genetisch interagieren (Tseng-Rogenski *et al.*, 2003) sind die Proteine nicht funktionell redundant (Abb. 57 und Abb. 58). Interessanterweise weist *DHH1* im Gegensatz zu *DBP5* keine genetische Interaktion mit den Translationsterminationsfaktoren *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3) auf (Abb. 47). Dadurch wird die spezifische Bedeutung der Funktion von Dbp5p, in der regulären Translationstermination von mRNA's involviert zu sein, bekräftigt.

Mutationen in der DEAD-Box RNA Helikase *TIF1*, die für den Translationsfaktor eIF4A kodiert, führen zu einem defekten NMD-Prozess und aufgrund dessen zu einer Stabilisierung von *nonsense* mRNA's (Ferraiuolo *et al.*, 2004; Palacios *et al.*, 2004; Shibuya *et al.*, 2004; Chamieh *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu zeigen *dbp5*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede in den Halbwertszeiten von verschiedenen mRNA's (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1998). Allerdings können einzelne, wenige mRNA's eine verlangsamte Abbaurate in *dbp5*-Mutanten aufweisen (Hillgren und Parker, 2001). Zusätzlich deutet das Fehlen von mRNA-Exportfaktoren in P-Körperchen, wie Dbp5p (Scarcelli *et al.*, 2008), auf dessen Nichtbeteiligung am NMD-Prozess hin. Dies legt nahe, dass Dbp5p bei der Erkennung von PTC's sowie beim Abbau aberranter mRNA's keine Funktion besitzt und stattdessen den regulären Translationsterminationsprozess beeinflusst. Es bleibt allerdings weiterhin offen, wie die Unterscheidung zwischen verfrühtem und regulärem Stopp-Kodon erfolgt.

5.7 Dbp5p ist ein genereller Terminationsfaktor

Es ist noch unklar, ob Dbp5p ein genereller Faktor für die Translationstermination ist oder den Terminationsprozess nur für spezifische mRNA's vermittelt. Durch eine mögliche Spezifität von Dbp5p zu mRNA's könnte Dbp5p die Effizienz der Translationstermination einzelner mRNA's regulieren. Eine Spezifität könnte durch die Einleitung der Termination aufgrund der drei verschiedenen, in Eukaryonten existierenden Stopp-Kodons vermittelt werden. Da Sup45p (eRF1) selbst nicht ausreichend für die Translationstermination ist,

benötigt es die unterstützende Funktion von Sup35p (eRF3) oder Dbp5p. Beispielsweise wird die Unterscheidung zwischen Stopp-Kodons und sehr ähnlichen, für eine Aminosäure kodierenden Kodons durch Sup35p (eRF3) vermittelt. Dabei führen die verschiedenen Stopp-Kodons in Abhängigkeit der benachbarten Nukleotide zu einer unterschiedlich hohen GTPase-Aktivität von Sup35p (eRF3) (Fan-Minogue *et al.*, 2008).

Darüber hinaus bleibt ebenfalls unklar, ob Sup35p (eRF3) bei der Erkennung von allen oder nur einzelnen Stopp-Kodons benötigt wird. Die effizienteste und akkurateste Termination erfolgt beim UAA-Stopp-Kodon (Poole *et al.*, 1995). Hingegen gehört das UGA-Stopp-Kodon zu den schwächsten Terminationssignalen, das zusätzlich durch die hohe Überleserate in den dualen Luziferasereporterversuchen im Wildtyp ersichtlich ist (Abb. 54). Allerdings beeinflussen nicht nur die unterschiedlichen Stopp-Kodons, vor allem von hochexprimierten Genen (Poole *et al.*, 1995), den Terminationsprozess, sondern auch die Nukleotide, die sich in der unmittelbaren Umgebung des Stopp-Kodons befinden (Bonetti *et al.*, 1995; McCaughan *et al.*, 1995; Tate *et al.*, 1995; Major *et al.*, 1996). Die spezifische Regulation der Termination wird über die Assoziation von Sup45p (eRF1) und Sup35p (eRF3) in Anwesenheit eines bestimmten Stopp-Kodons moduliert (Fan-Minogue *et al.*, 2008), so dass Dbp5p aufgrund der Kontrolle der Interaktion beider Proteine ebenfalls regulierend wirken könnte. Jedoch ist derzeit unklar, ob Dbp5p gleichermaßen zur effizienten Erkennung der drei verschiedenen Stopp-Kodons beiträgt oder eine Spezifität aufweist.

Zusammenfassend wurde neben Npl3p mit Dbp5p ein weiteres Protein charakterisiert, das den mRNA-Export mit der Translation koppelt. Im Gegensatz zu anderen mRNA-bindenden Proteinen wirkt Dbp5p nicht nur regulatorisch auf die Translation, sondern ist ebenso direkt und aktiv im Translationsprozess involviert und moduliert diesen. Dbp5p kontrolliert die Interaktion der GTPase Sup35p (eRF3) mit Sup45p (eRF1) und wirkt aufgrund dessen regulatorisch auf die Translationstermination. Spätestens, wenn das 80S-Ribosom ein Stopp-Kodon erreicht, wird Sup45p (eRF1) unabhängig von Dbp5p an dieses rekrutiert. Allerdings wird die gleichzeitige Assoziation von Sup45p (eRF1) mit Sup35p (eRF3) an dem 80S-Ribosom durch Dbp5p verhindert. Möglicherweise kontrolliert Dbp5p die korrekte Positionierung von Sup45p (eRF1) an das Stopp-Kodon. Die notwendige katalytische Aktivität der DEAD-Box RNA-Helikase könnte beispielsweise etwaige stattfindende Umstrukturierungen des mit 80S-Ribosomen-assoziierten mRNP-Komplexes gewährleisten. Diese wird höchstwahrscheinlich durch das stimulierend wirkende Gle1p und das Signalmolekül InsP₆ reguliert (Bolger *et al.*, 2008). Nach der

Dissoziation von Dbp5p erfolgt die Assoziation von Sup35p (eRF3) mit dem Terminationskomplex, so dass Dbp5p zum einen die effiziente Translationstermination und zum anderen die nachfolgenden, durch Sup35p (eRF3)-vermittelten Prozesse gewährleistet. Es bleibt offen, ob das bislang wenig charakterisierte humane Homolog DDX19B ähnliche Funktion bei der Translation besitzt (Collins *et al.*, 2009; von Moeller *et al.*, 2009).

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Zusammenfassung

Durch die Kompartimentierung einer eukaryontischen Zelle erfolgen die Genexpression und die Proteinbiosynthese an verschiedenen Orten. Im Zellkern findet die Transkription der Gene in die komplementären prä-mRNA's statt, die durch die nukleäre Prozessierung zu exportkompetenten mRNA's reifen. Diese werden dann in Assoziation mit Proteinen als mRNP-Komplexe durch die Kernporenkomplexe (NPC's) der Zellkernmembran in das Zytoplasma transportiert, wo anschließend die Translation erfolgt. Bei dieser wird der genetische Code der mRNA mit Hilfe der Ribosomen in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt. An dem mRNA-Export ins Zytoplasma sind zahlreiche mRNA-bindende Proteine beteiligt, von denen ein Großteil unmittelbar nach der Translokation von der mRNA dissoziiert. Im Gegensatz dazu verbleiben einige dieser mRNA-bindenden Proteine, wie die DEAD-Box RNA-Helikase Dbp5p oder das pendelnde SR-Protein Npl3p in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, auch während der Translation an der mRNA. Dies weist auf mögliche Funktionen dieser Proteine in der Translation hin, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Genetische, zellbiologische und biochemische Analysen zeigen, dass Npl3p und Dbp5p in unterschiedlichen Phasen der Translation involviert sind. Im ersten Teil der Arbeit wurde durch Lokalisationsstudien und Analysen von physikalischen Interaktionen Npl3p als ein neuer Exportfaktor der ribosomalen prä-60S-Untereinheit charakterisiert. Zusätzlich bestätigen identifizierte genetische Interaktionen von *NPL3* mit den bereits bekannten Exportfaktoren der prä-60S-Untereinheit, *XPO1*, *MTR2* und *NMD3*, die Transportfunktion von Npl3p. Des Weiteren führt eine Deletion von *NPL3* (*npl3Δ*) zu einer reduzierten Wachstumsrate, die nicht durch Exportdefekte der prä-60S-Untereinheit, sondern durch Translationsdefekte verursacht wird. Die Translationsdefekte werden durch eine reduzierte Monosomenanzahl (80S) hervorgerufen, die durch eine verringerte Assoziation der 40S-Untereinheit mit der 60S-Untereinheit beim finalen Schritt der Translationsinitiation, dem *Subunit Joining*, entstehen. Dies verdeutlichen sowohl genetische als auch physikalische Interaktionen von *NPL3* bzw. Npl3p mit Faktoren, die am Prozess des *Subunit Joinings* beteiligt sind. Weitere Untersuchungen zeigen, dass Npl3p über seinen Carboxyterminus Homodimere oder Homooligomere ausbilden kann. Demzufolge könnte die Verknüpfung beider mRNP's bei der Assemblierung des 80S-Ribosoms nach dem

Npl3p-vermittelten Export der mRNA und der prä-60S-Untereinheit in das Zytoplasma über diese Npl3p-Npl3p-Interaktion erfolgen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine aktive Funktion von Dbp5p bei der Translations-termination charakterisiert. Eine generelle Funktion von Dbp5p während der Translation wird durch das schlechtere Wachstum von *dbp5*-Mutanten in Anwesenheit von Translationsinhibitoren ersichtlich. *DBP5* interagiert genetisch sowohl mit beiden Translations-terminationsfaktoren *SUP45* (eRF1) und *SUP35* (eRF3), als auch mit dem poly(A)-bindenden Faktor *PAB1*. In Reporterversuchen wird deutlich, dass die katalytische Aktivität von Dbp5p für die effiziente Erkennung des Stopp-Kodons durch Sup45p (eRF1) erforderlich ist. Des Weiteren interagiert Dbp5p physikalisch mit Sup45p (eRF1), jedoch nicht mit Sup35p (eRF3) oder Pab1p. In *dbp5*-Mutanten ist die Ko-Sedimentation von Sup35p (eRF3) mit Polysomen erheblich reduziert und die Assoziation von Sup45p (eRF1) mit Sup35p (eRF3) verhindert. Daher scheint Dbp5p die Rekrutierung von Sup35p in den Terminationskomplex zu kontrollieren. Weitere Experimente zeigen, dass Dbp5p die Interaktion von Sup45p und Sup35p ausschließlich bei der regulären Translations-termination, nicht jedoch im *Nonsense*-vermittelten mRNA-Abbau (*nonsense-mediated mRNA decay*, NMD) reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die beiden mRNA-Exportfaktoren Npl3p und Dbp5p neue Funktionen in der Translation identifiziert und näher charakterisiert, so dass ersichtlich wird, dass diese Proteine die beiden Prozesse, mRNA-Export und Translation, miteinander verbinden. Dies offenbart zum einen die Multifunktionalität dieser Proteine. Zum anderen zeigt die Verwendung derselben Proteine in den beiden Prozessen die effiziente Regulation in einer eukaryontischen Zelle.

6.2 *English Summary*

The compartmentalization between nucleus and cytoplasm is the principal defining feature of eukaryotic cells and leads to the spatial separation of transcription and translation. Transcription occurs in the nucleus resulting in the complementary pre-mRNA which is processed into an export competent mRNA. The assembly of export mediating proteins with the mRNA facilitates the transport of the mRNP complex through the nuclear pore complexes (NPCs), which are embedded in the nuclear envelope, into the cytoplasm. Subsequently, protein synthesis occurs at the ribosomes in the cytoplasm by decoding the genetic code of the mRNA into the amino acid sequence of the encoded proteins. Numerous mRNA binding proteins are involved in the export of an mRNA into the cytoplasm. The majority of those proteins dissociates from the mRNA immediately upon their translocation. In contrast, some mRNA binding proteins like the DEAD box RNA helicase Dbp5p or the shuttling SR-protein Npl3p as shown in *Saccharomyces cerevisiae* remain bound to the mRNA during translation. This suggests possible functions of these proteins in translation, which were examined in this work.

Genetical, cell biological, and biochemical data show that Npl3p and Dbp5p are involved in different phases of translation. In the first part of this thesis it is demonstrated by localization studies and analyses of physical interactions that Npl3p functions as a new export factor for the ribosomal pre-60S subunit. Additionally, genetic interactions of *NPL3* with factors already known for their function in the export of the pre-60S subunit, *XPO1*, *MTR2* and *NMD3*, confirm the transport function of Npl3p. Moreover, deletion of *NPL3* (*npl3Δ*) leads to a reduced growth rate, which is caused by defects in translation but not by export defects of the pre-60S subunit. Those translational defects are caused by a reduced amount of monosomes (80S) due to a lower rate of 40S and 60S subunit association during the final step of translation initiation, the subunit joining. The novel role of Npl3p in supporting subunit joining during translation initiation is supported by both, genetical and physical interactions of *NPL3* and/or Npl3p with factors involved in subunit joining. Further investigations demonstrate that Npl3p can form homodimers or homooligomers. Since Npl3p is associated with the exported mRNP and the pre-60S subunit, it might act by helping to connect both ribonucleoparticles through its self-association interaction and thereby promotes the stabilization of the 80S formation during subunit joining.

In the second part of this thesis, an active function of Dbp5p during translation termination was characterized. A general role of Dbp5p during translation is supported by hypersensitivity of *dbp5*-mutants to translation inhibitors. Moreover, *DBP5* interacts

genetically not only with both translation termination factors *SUP45* (eRF1) and *SUP35* (eRF3) but also with the poly(A)-binding factor *PAB1*. Reporter assays show a requirement of the catalytic activity of Dbp5p for efficient stop codon recognition through Sup45p (eRF1). Additionally, Dbp5p interacts physically with Sup45p (eRF1), however not with Sup35p (eRF3) or Pab1p. Furthermore, mutants of *DBP5* show a substantially reduced co-sedimentation of Sup35p (eRF3) with polysomes and a loss of the interaction between Sup45p (eRF1) and Sup35p (eRF3). This indicates an important role of Dbp5p for the recruitment of Sup35p (eRF3) into the termination complex. Thus, Dbp5p regulates the interaction of Sup45p (eRF1) and Sup35p (eRF3) in translation termination, however it does not seem to be involved in the termination process of premature termination codon (PTC)-containing mRNAs that triggers nonsense-mediated mRNA decay (NMD).

In this thesis new functions of both mRNA export factors Npl3p and Dbp5p were identified and characterized during translation demonstrating the connection of both processes, mRNA-export and translation, through those proteins. This reveals on the one hand the multifunctionality of Npl3p and Dbp5p and on the other hand the efficiency in nature to regulate both cellular processes in eukaryotes with the same molecules.

7 Referenzen

- Abruzzi KC, Belostotsky DA, Chekanova JA, Dower K, Rosbash M: (2006). 3'-end formation signals modulate the association of genes with the nuclear periphery as well as mRNP dot formation. *EMBO J*, 25(18): 4253-62.
- Abruzzi KC, Lacadie S, Rosbash M: (2004). Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *EMBO J*, 23(13): 2620-31.
- Aguilera A: (2005a). Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3): 242-50.
- Aguilera A: (2005b). mRNA processing and genomic instability. *Nat Struct Mol Biol*, 12(9): 737-8.
- Alcazar-Roman AR, Tran EJ, Guo S, Wente SR: (2006). Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nat Cell Biol*, 8(7): 711-6.
- Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E, Goldberg MW: (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci*, 113 (Pt 10): 1651-9.
- Amrani N, Dong S, He F, Ganesan R, Ghosh S, Kervestin S, Li C, Mangus DA, Spatrick P, Jacobson A: (2006). Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 1): 39-42.
- Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, Mangus DA, Ghosh S, Jacobson A: (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, 432(7013): 112-8.
- Amrani N, Ghosh S, Mangus DA, Jacobson A: (2008). Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature*, 453(7199): 1276-80.
- Anderson P, Kedersha N: (2006). RNA granules. *J Cell Biol*, 172(6): 803-8.
- Bachi A *et al.*: (2000). The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *Rna*, 6(1): 136-58.
- Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T: (2007). Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*, 5(2): 128-40.
- Bassler J, Grandi P, Gadad O, Lessmann T, Petfalski E, Tollervey D, Lechner J, Hurt E: (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell*, 8(3): 517-29.
- Bassler J, Kallas M, Hurt E: (2006). The NUG1 GTPase reveals an N-terminal RNA-binding domain that is essential for association with 60 S pre-ribosomal particles. *J Biol Chem*, 281(34): 24737-44.
- Basu U, Si K, Deng H, Maitra U: (2003). Phosphorylation of mammalian eukaryotic translation initiation factor 6 and its *Saccharomyces cerevisiae* homologue Tif6p: evidence that phosphorylation of Tif6p regulates its nucleocytoplasmic distribution and is required for yeast cell growth. *Mol Cell Biol*, 23(17): 6187-99.
- Basu U, Si K, Warner JR, Maitra U: (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol Cell Biol*, 21(5): 1453-62.
- Beckham C, Hilliker A, Cziko AM, Noueiry A, Ramaswami M, Parker R: (2008). The DEAD-box RNA helicase Ded1p affects and accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* P-bodies. *Mol Biol Cell*, 19(3): 984-93.

- Behm-Ansmant I, Izaurralde E: (2006). Quality control of gene expression: a stepwise assembly pathway for the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev*, 20(4): 391-8.
- Behm-Ansmant I, Kashima I, Rehwinkel J, Sauliere J, Wittkopp N, Izaurralde E: (2007). mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett*, 581(15): 2845-53.
- Belgareh N, Snay-Hodge C, Pasteau F, Dagher S, Cole CN, Doye V: (1998). Functional characterization of a Nup159p-containing nuclear pore subcomplex. *Mol Biol Cell*, 9(12): 3475-92.
- Bentley DL: (2005). Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3): 251-6.
- Birney E, Kumar S, Krainer AR: (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res*, 21(25): 5803-16.
- Bischoff FR, Scheffzek K, Ponstingl H: (2002). How Ran is regulated. *Results Probl Cell Differ*, 35: 49-66.
- Bolger TA, Folkmann AW, Tran EJ, Wentz SR: (2008). The mRNA export factor Gle1 and inositol hexakisphosphate regulate distinct stages of translation. *Cell*, 134(4): 624-33.
- Bonetti B, Fu L, Moon J, Bedwell DM: (1995). The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 251(3): 334-45.
- Bossie MA, DeHoratius C, Barcelo G, Silver P: (1992). A mutant nuclear protein with similarity to RNA binding proteins interferes with nuclear import in yeast. *Mol Biol Cell*, 3(8): 875-93.
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD: (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14(2): 115-32.
- Bradatsch B *et al.*: (2007). Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S preribosomal subunit. *Mol Cell*, 27(5): 767-79.
- Brais B: (2003). Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenet Genome Res*, 100(1-4): 252-60.
- Braun IC, Herold A, Rode M, Izaurralde E: (2002). Nuclear export of mRNA by TAP/NXF1 requires two nucleoporin-binding sites but not p15. *Mol Cell Biol*, 22(15): 5405-18.
- Brickner JH, Walter P: (2004). Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol*, 2(11): e342.
- Brune C, Munchel SE, Fischer N, Podtelejnikov AV, Weis K: (2005). Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *RNA*, 11(4): 517-31.
- Bucheli ME, Buratowski S: (2005). Npl3 is an antagonist of mRNA 3' end formation by RNA polymerase II. *EMBO J*, 24(12): 2150-60.
- Bucheli ME, He X, Kaplan CD, Moore CL, Buratowski S: (2007). Polyadenylation site choice in yeast is affected by competition between Npl3 and polyadenylation factor CFI. *RNA*, 13(10): 1756-64.
- Burkard KT, Butler JS: (2000). A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with Poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Mol Cell Biol*, 20(2): 604-16.
- Caceres JF, Krainer AR: (1993). Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *EMBO J*, 12(12): 4715-26.

- Caceres JF, Screaton GR, Krainer AR: (1998). A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev*, 12(1): 55-66.
- Cao D, Parker R: (2003). Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell*, 113(4): 533-45.
- Casolari JM, Brown CR, Drubin DA, Rando OJ, Silver PA: (2005). Developmentally induced changes in transcriptional program alter spatial organization across chromosomes. *Genes Dev*, 19(10): 1188-98.
- Casolari JM, Silver PA: (2004). Guardian at the gate: preventing unspliced pre-mRNA export. *Trends Cell Biol*, 14(5): 222-5.
- Chamieh H, Ballut L, Bonneau F, Le Hir H: (2008). NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat Struct Mol Biol*, 15(1): 85-93.
- Chan CC, Dostie J, Diem MD, Feng W, Mann M, Rappsilber J, Dreyfuss G: (2004). eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA*, 10(2): 200-9.
- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF: (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*, 76: 51-74.
- Chauvin C, Salhi S, Jean-Jean O: (2007). Human eukaryotic release factor 3a depletion causes cell cycle arrest at G1 phase through inhibition of the mTOR pathway. *Mol Cell Biol*, 27(16): 5619-29.
- Chekanova JA, Abruzzi KC, Rosbash M, Belostotsky DA: (2008). Sus1, Sac3, and Thp1 mediate post-transcriptional tethering of active genes to the nuclear rim as well as to non-nascent mRNP. *RNA*, 14(1): 66-77.
- Chekanova JA, Belostotsky DA: (2003). Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *Rna*, 9(12): 1476-1490.
- Cheng H, Dufu K, Lee CS, Hsu JL, Dias A, Reed R: (2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell*, 127(7): 1389-400.
- Choi SK, Lee JH, Zoll WL, Merrick WC, Dever TE: (1998). Promotion of met-tRNA^{iMet} binding to ribosomes by yIF2, a bacterial IF2 homolog in yeast. *Science*, 280(5370): 1757-60.
- Clouse KN, Luo MJ, Zhou Z, Reed R: (2001). A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA. *Nat Cell Biol*, 3(1): 97-9.
- Cole CN, Scarcelli JJ: (2006). Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*, 18(3): 299-306.
- Coller J, Parker R: (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell*, 122(6): 875-86.
- Collins R, Karlberg T, Lehtio L, Schutz P, van den Berg S, Dahlgren LG, Hammarstrom M, Weigelt J, Schuler H: (2009). The DEXD/H-box RNA Helicase DDX19 Is Regulated by an α -Helical Switch. *J Biol Chem*, 284(16): 10296-300.
- Colwill K, Feng LL, Yeakley JM, Gish GD, Caceres JF, Pawson T, Fu XD: (1996). SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J Biol Chem*, 271(40): 24569-75.
- Conne B, Stutz A, Vassalli JD: (2000). The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med*, 6(6): 637-41.
- Conti E, Izaurralde E: (2001). Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol*, 13(3): 310-9.
- Conti E, Izaurralde E: (2005). Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3): 316-25.
- Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P: (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 367: 17-37.

- Cosson B, Couturier A, Chabelskaya S, Kiktev D, Inge-Vechtomov S, Philippe M, Zhouravleva G: (2002). Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [PSI(+)] propagation. *Mol Cell Biol*, 22(10): 3301-15.
- Costanzo MC *et al.*: (2000). The yeast proteome database (YPD) and *Caenorhabditis elegans* proteome database (WormPD): comprehensive resources for the organization and comparison of model organism protein information. *Nucleic Acids Res*, 28(1): 73-6.
- Cougot N, Babajko S, Seraphin B: (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol*, 165(1): 31-40.
- Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ: (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 158(5): 915-27.
- Cui Y, Hagan KW, Zhang S, Peltz SW: (1995). Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev*, 9(4): 423-36.
- Cullen BR: (2003). Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci*, 28(8): 419-24.
- Czaplinski K, Ruiz-Echevarria MJ, Paushkin SV, Han X, Weng Y, Perlick HA, Dietz HC, Ter-Avanesyan MD, Peltz SW: (1998). The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev*, 12(11): 1665-77.
- Dagkessamanskaya A, Ter-Avanesyan M, Mager WH: (1997). Transcriptional regulation of SUP35 and SUP45 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(13): 1265-74.
- Daneholt B: (2001). Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13): 7012-7.
- de la Cruz J, Kressler D, Linder P: (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci*, 24(5): 192-8.
- Deka P, Bucheli ME, Moore C, Buratowski S, Varani G: (2008). Structure of the yeast SR protein Npl3 and Interaction with mRNA 3'-end processing signals. *J Mol Biol*, 375(1): 136-50.
- Demoinet E, Jacquier A, Lutfalla G, Fromont-Racine M: (2007). The Hsp40 chaperone Jjj1 is required for the nucleo-cytoplasmic recycling of preribosomal factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 13(9): 1570-81.
- Denning D, Mykytka B, Allen NP, Huang L, Al B, Rexach M: (2001). The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p-GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 154(5): 937-50.
- Dermody JL, Dreyfuss JM, Villen J, Ogundipe B, Gygi SP, Park PJ, Ponticelli AS, Moore CL, Buratowski S, Bucheli ME: (2008). Unphosphorylated SR-like protein Npl3 stimulates RNA polymerase II elongation. *PLoS ONE*, 3(9): e3273.
- Dever TE: (1999). Translation initiation: adept at adapting. *Trends Biochem Sci*, 24(10): 398-403.
- Dever TE: (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, 108(4): 545-56.
- Dieppo G, Iglesias N, Stutz F: (2006). Cotranscriptional recruitment to the mRNA export receptor Mex67p contributes to nuclear pore anchoring of activated genes. *Mol Cell Biol*, 26(21): 7858-70.
- Dimaano C, Ullman KS: (2004). Nucleocytoplasmic transport: integrating mRNA production and turnover with export through the nuclear pore. *Mol Cell Biol*, 24(8): 3069-76.
- Dostie J, Dreyfuss G: (2002). Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr Biol*, 12(13): 1060-7.

- Doudna JA, Rath VL: (2002). Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier. *Cell*, 109(2): 153-6.
- Doye V, Hurt E: (1997). From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol*, 9(3): 401-11.
- Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N: (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(3): 195-205.
- Dunn EF, Hammell CM, Hodge CA, Cole CN: (2005). Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes Dev*, 19(1): 90-103.
- Ebihara K, Nakamura Y: (1999). C-terminal interaction of translational release factors eRF1 and eRF3 of fission yeast: G-domain uncoupled binding and the role of conserved amino acids. *RNA*, 5(6): 739-50.
- Eisinger DP, Dick FA, Denke E, Trumpower BL: (1997). SQT1, which encodes an essential WD domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, suppresses dominant-negative mutations of the ribosomal protein gene QSR1. *Mol Cell Biol*, 17(9): 5146-55.
- El-Baradi TT, Raue HA, De Regt CH, Planta RJ: (1984). Stepwise dissociation of yeast 60S ribosomal subunits by LiCl and identification of L25 as a primary 26S rRNA binding protein. *Eur J Biochem*, 144(2): 393-400.
- el-Baradi TT, Raue HA, de Regt VC, Verbree EC, Planta RJ: (1985). Yeast ribosomal protein L25 binds to an evolutionary conserved site on yeast 26S and *E. coli* 23S rRNA. *EMBO J*, 4(8): 2101-7.
- Englmeier L, Olivo JC, Mattaj IW: (1999). Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol*, 9(1): 30-41.
- Erkman JA, Kutay U: (2004). Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp Cell Res*, 296(1): 12-20.
- Estruch F, Cole CN: (2003). An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components. *Mol Biol Cell*, 14(4): 1664-76.
- Estruch F, Hodge CA, Rodriguez-Navarro S, Cole CN: (2005). Physical and genetic interactions link the yeast protein Zds1p with mRNA nuclear export. *J Biol Chem*, 280(10): 9691-7.
- Fahrenkrog B, Aebi U: (2003). The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(10): 757-66.
- Fahrenkrog B, Stoffler D, Aebi U: (2001). Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol*, 259: 95-117.
- Falvey AK, Staehelin T: (1970a). Structure and function of mammalian ribosomes. I. Isolation and characterization of active liver ribosomal subunits. *J Mol Biol*, 53(1): 1-19.
- Falvey AK, Staehelin T: (1970b). Structure and function of mammalian ribosomes. II. Exchange of ribosomal subunits at various stages of in vitro polypeptide synthesis. *J Mol Biol*, 53(1): 21-34.
- Fan-Minogue H, Du M, Pisarev AV, Kallmeyer AK, Salas-Marco J, Keeling KM, Thompson SR, Pestova TV, Bedwell DM: (2008). Distinct eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination. *Mol Cell*, 30(5): 599-609.
- Fasken MB, Corbett AH: (2005). Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol*, 12(6): 482-8.

- Fasken MB, Stewart M, Corbett AH: (2008). Functional significance of the interaction between the mRNA-binding protein, Nab2, and the nuclear pore-associated protein, Mlp1, in mRNA export. *J Biol Chem*.
- Fatica A, Oeffinger M, Dlakic M, Tollervey D: (2003). Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol Cell Biol*, 23(5): 1798-807.
- Fatica A, Tollervey D, Dlakic M: (2004). PIN domain of Nob1p is required for D-site cleavage in 20S pre-rRNA. *RNA*, 10(11): 1698-701.
- Faustino NA, Cooper TA: (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, 17(4): 419-37.
- Feldherr CM, Akin D: (1997). The location of the transport gate in the nuclear pore complex. *J Cell Sci*, 110 (Pt 24): 3065-70.
- Ferraiuolo MA, Lee CS, Ler LW, Hsu JL, Costa-Mattioli M, Luo MJ, Reed R, Sonenberg N: (2004). A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(12): 4118-23.
- Ferreira-Cerca S, Poll G, Gleizes PE, Tschochner H, Milkereit P: (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol Cell*, 20(2): 263-75.
- Ferreira-Cerca S, Poll G, Kuhn H, Neueder A, Jakob S, Tschochner H, Milkereit P: (2007). Analysis of the in vivo assembly pathway of eukaryotic 40S ribosomal proteins. *Mol Cell*, 28(3): 446-57.
- Fillman C, Lykke-Andersen J: (2005). RNA decapping inside and outside of processing bodies. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3): 326-31.
- Fischer T, Strasser K, Racz A, Rodriguez-Navarro S, Oppizzi M, Ihrig P, Lechner J, Hurt E: (2002). The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *EMBO J*, 21(21): 5843-52.
- Flach J, Bossie M, Vogel J, Corbett A, Jinks T, Willins DA, Silver PA: (1994). A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Cell Biol*, 14(12): 8399-407.
- Fontoura BM, Blobel G, Matunis MJ: (1999). A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J Cell Biol*, 144(6): 1097-112.
- Foury F: (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 195(1): 1-10.
- Fried H, Kutay U: (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci*, 60(8): 1659-88.
- Frolova LY, Tsivkovskii RY, Sivolobova GF, Oparina NY, Serpinsky OI, Blinov VM, Tatkov SI, Kisselev LL: (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA*, 5(8): 1014-20.
- Gaba A, Wang Z, Krishnamoorthy T, Hinnebusch AG, Sachs MS: (2001). Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. *EMBO J*, 20(22): 6453-63.
- Gadal O, Strauss D, Braspenning J, Hoepfner D, Petfalski E, Philippsen P, Tollervey D, Hurt E: (2001a). A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *EMBO J*, 20(14): 3695-704.
- Gadal O, Strauss D, Kessel J, Trumpower B, Tollervey D, Hurt E: (2001b). Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol*, 21(10): 3405-15.

- Gadal O, Strauss D, Petfalski E, Gleizes PE, Gas N, Tollervey D, Hurt E: (2002). Rlp7p is associated with 60S preribosomes, restricted to the granular component of the nucleolus, and required for pre-rRNA processing. *J Cell Biol*, 157(6): 941-51.
- Galani K, Nissan TA, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E: (2004). Real, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60 S subunits. *J Biol Chem*, 279(53): 55411-8.
- Gallardo M, Luna R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Aguilera A: (2003). Nab2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism. *J Biol Chem*, 278(26): 24225-32.
- Gallouzi IE, Steitz JA: (2001). Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science*, 294(5548): 1895-901.
- Galy V, Gadal O, Fromont-Racine M, Romano A, Jacquier A, Nehrbass U: (2004). Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell*, 116(1): 63-73.
- Galy V, Olivo-Marin JC, Scherthan H, Doye V, Rascalou N, Nehrbass U: (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature*, 403(6765): 108-12.
- Gama-Carvalho M, Barbosa-Morais NL, Brodsky AS, Silver PA, Carmo-Fonseca M: (2006). Genome-wide identification of functionally distinct subsets of cellular mRNAs associated with two nucleocytoplasmic-shuttling mammalian splicing factors. *Genome Biol*, 7(11): R113.
- Gama-Carvalho M, Carmo-Fonseca M: (2001). The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins. *FEBS Lett*, 498(2-3): 157-63.
- Garcia-Rubio M, Chavez S, Huertas P, Tous C, Jimeno S, Luna R, Aguilera A: (2008). Different physiological relevance of yeast THO/TREX subunits in gene expression and genome integrity. *Mol Genet Genomics*, 279(2): 123-32.
- Gatfield D, Unterholzner L, Ciccarelli FD, Bork P, Izaurralde E: (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *EMBO J*, 22(15): 3960-70.
- Gavin AC *et al.*: (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, 440(7084): 631-6.
- Ghaemmighami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS: (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959): 737-41.
- Gilbert W, Guthrie C: (2004). The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Mol Cell*, 13(2): 201-12.
- Gilbert W, Siebel CW, Guthrie C: (2001). Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA*, 7(2): 302-13.
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N: (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, 13(11): 1422-37.
- Giorgi C, Moore MJ: (2007). The nuclear nurture and cytoplasmic nature of localized mRNPs. *Semin Cell Dev Biol*, 18(2): 186-93.
- Gleizes PE, Noaillac-Depeyre J, Leger-Silvestre I, Teulieres F, Dauxois JY, Pommet D, Azum-Gelade MC, Gas N: (2001). Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J Cell Biol*, 155(6): 923-36.
- Goffeau A *et al.*: (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287): 546, 563-7.
- Goldberg MW, Allen TD: (1995). Structural and functional organization of the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol*, 7(3): 301-9.

- Gonzalez-Aguilera C, Tous C, Gomez-Gonzalez B, Huertas P, Luna R, Aguilera A: (2008). The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 Complex Works in Transcription Elongation-mRNA Export Preventing RNA-Mediated Genome Instability. *Mol Biol Cell*.
- Gonzalez CI, Ruiz-Echevarria MJ, Vasudevan S, Henry MF, Peltz SW: (2000). The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell*, 5(3): 489-99.
- Gorlich D, Dabrowski M, Bischoff FR, Kutay U, Bork P, Hartmann E, Prehn S, Izaurralde E: (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol*, 138(1): 65-80.
- Gorlich D, Kutay U: (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15: 607-60.
- Gorsch LC, Dockendorff TC, Cole CN: (1995). A conditional allele of the novel repeat-containing yeast nucleoporin RAT7/NUP159 causes both rapid cessation of mRNA export and reversible clustering of nuclear pore complexes. *J Cell Biol*, 129(4): 939-55.
- Gottschalk A *et al.*: (1998). A comprehensive biochemical and genetic analysis of the yeast U1 snRNP reveals five novel proteins. *RNA*, 4(4): 374-93.
- Grant RP, Marshall NJ, Yang JC, Fasken MB, Kelly SM, Harreman MT, Neuhaus D, Corbett AH, Stewart M: (2008). Structure of the N-terminal Mlp1-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein, Nab2. *J Mol Biol*, 376(4): 1048-59.
- Gratzer S, Beilharz T, Beddoe T, Henry MF, Lithgow T: (2000). The mitochondrial protein targeting suppressor (*mts1*) mutation maps to the mRNA-binding domain of Npl3p and affects translation on cytoplasmic polysomes. *Mol Microbiol*, 35(6): 1277-85.
- Graveley BR: (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6(9): 1197-211.
- Green DM, Johnson CP, Hagan H, Corbett AH: (2003). The C-terminal domain of myosin-like protein 1 (Mlp1p) is a docking site for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins that are required for mRNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3): 1010-5.
- Green DM, Marfatia KA, Crafton EB, Zhang X, Cheng X, Corbett AH: (2002). Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J Biol Chem*, 277(10): 7752-60.
- Hacker S, Krebber H: (2004). Differential export requirements for shuttling serine/arginine-type mRNA-binding proteins. *J Biol Chem*, 279(7): 5049-52.
- Hammell CM, Gross S, Zenklusen D, Heath CV, Stutz F, Moore C, Cole CN: (2002). Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. *Mol Cell Biol*, 22(18): 6441-57.
- Hargous Y, Hautbergue GM, Tintaru AM, Skrisovska L, Golovanov AP, Stevenin J, Lian LY, Wilson SA, Allain FH: (2006). Molecular basis of RNA recognition and TAP binding by the SR proteins SRp20 and 9G8. *EMBO J*, 25(21): 5126-37.
- He F, Brown AH, Jacobson A: (1997). Upf1p, Nmd2p, and Upf3p are interacting components of the yeast nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol Cell Biol*, 17(3): 1580-94.
- He F, Li X, Spatrick P, Casillo R, Dong S, Jacobson A: (2003). Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell*, 12(6): 1439-52.
- Hector RE, Nykamp KR, Dheur S, Anderson JT, Non PJ, Urbinati CR, Wilson SM, Minvielle-Sebastia L, Swanson MS: (2002). Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. *EMBO J*, 21(7): 1800-10.

- Hedges J, Chen YI, West M, Bussiere C, Johnson AW: (2006). Mapping the functional domains of yeast NMD3, the nuclear export adapter for the 60 S ribosomal subunit. *J Biol Chem*, 281(48): 36579-87.
- Hedges J, West M, Johnson AW: (2005). Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *EMBO J*, 24(3): 567-79.
- Henry MF, Silver PA: (1996). A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)+-RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*, 16(7): 3668-78.
- Hieronymus H, Silver PA: (2003). Genome-wide analysis of RNA-protein interactions illustrates specificity of the mRNA export machinery. *Nat Genet*, 33(2): 155-61.
- Hieter P, Bassett DE, Jr., Valle D: (1996). The yeast genome--a common currency. *Nat Genet*, 13(3): 253-5.
- Hilleren P, Parker R: (2001). Defects in the mRNA export factors Rat7p, Gle1p, Mex67p, and Rat8p cause hyperadenylation during 3'-end formation of nascent transcripts. *RNA*, 7(5): 753-64.
- Hillman RT, Green RE, Brenner SE: (2004). An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome Biol*, 5(2): R8.
- Ho JH, Johnson AW: (1999). NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 19(3): 2389-99.
- Ho JH, Kallstrom G, Johnson AW: (2000). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol*, 151(5): 1057-66.
- Hodge CA, Colot HV, Stafford P, Cole CN: (1999). Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *EMBO J*, 18(20): 5778-88.
- Hodgkin J, Papp A, Pulak R, Ambros V, Anderson P: (1989). A new kind of informational suppression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 123(2): 301-13.
- Hoshino S, Imai M, Mizutani M, Kikuchi Y, Hanaoka F, Ui M, Katada T: (1998). Molecular cloning of a novel member of the eukaryotic polypeptide chain-releasing factors (eRF). Its identification as eRF3 interacting with eRF1. *J Biol Chem*, 273(35): 22254-9.
- Houseley J, LaCava J, Tollervey D: (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7): 529-39.
- Huang Y, Gattoni R, Stevenin J, Steitz JA: (2003). SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell*, 11(3): 837-43.
- Huang Y, Steitz JA: (2005). SRprises along a messenger's journey. *Mol Cell*, 17(5): 613-5.
- Hung NJ, Johnson AW: (2006). Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 26(10): 3718-27.
- Hung NJ, Lo KY, Patel SS, Helmke K, Johnson AW: (2008). Arx1 is a nuclear export receptor for the 60S ribosomal subunit in yeast. *Mol Biol Cell*, 19(2): 735-44.
- Hurt E, Hannus S, Schmelzl B, Lau D, Tollervey D, Simos G: (1999). A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *J Cell Biol*, 144(3): 389-401.
- Inge-Vechtomov S, Zhouravleva G, Philippe M: (2003). Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biol Cell*, 95(3-4): 195-209.
- Iost I, Dreyfus M, Linder P: (1999). Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J Biol Chem*, 274(25): 17677-83.
- Isken O, Maquat LE: (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev*, 21(15): 1833-56.

- Isken O, Maquat LE: (2008). The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet*.
- Ito K, Ebihara K, Nakamura Y: (1998). The stretch of C-terminal acidic amino acids of translational release factor eRF1 is a primary binding site for eRF3 of fission yeast. *RNA*, 4(8): 958-72.
- Ivanov PV, Gehring NH, Kunz JB, Hentze MW, Kulozik AE: (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J*, 27(5): 736-47.
- Izaurrealde E: (2004). Directing mRNA export. *Nat Struct Mol Biol*, 11(3): 210-2.
- Jacobson A: (2005). The end justifies the means. *Nat Struct Mol Biol*, 12(6): 474-5.
- Jaggi RD, Franco-Obregon A, Ensslin K: (2003). Quantitative topographical analysis of nuclear pore complex function using scanning force microscopy. *Biophys J*, 85(6): 4093-8.
- Jakel S, Gorlich D: (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J*, 17(15): 4491-502.
- Jankowsky E, Fairman ME: (2007). RNA helicases--one fold for many functions. *Curr Opin Struct Biol*, 17(3): 316-24.
- Jankowsky E, Fairman ME, Yang Q: (2005). RNA helicases: versatile ATP-driven nanomotors. *J Nanosci Nanotechnol*, 5(12): 1983-9.
- Jensen TH, Dower K, Libri D, Rosbash M: (2003). Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Mol Cell*, 11(5): 1129-38.
- Jimeno S, Rondon AG, Luna R, Aguilera A: (2002). The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J*, 21(13): 3526-35.
- Kadowaki T, Hitomi M, Chen S, Tartakoff AM: (1994). Nuclear mRNA accumulation causes nucleolar fragmentation in yeast mtr2 mutant. *Mol Biol Cell*, 5(11): 1253-63.
- Kaempfer R: (1969). Ribosomal subunit exchange in the cytoplasm of a eukaryote. *Nature*, 222(5197): 950-3.
- Kaffman A, O'Shea EK: (1999). Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15: 291-339.
- Kallstrom G, Hedges J, Johnson A: (2003). The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol Cell Biol*, 23(12): 4344-55.
- Karl T *et al.*: (1999). GRC5 and NMD3 function in translational control of gene expression and interact genetically. *Curr Genet*, 34(6): 419-29.
- Katahira J, Straesser K, Saiwaki T, Yoneda Y, Hurt E: (2002). Complex formation between Tap and p15 affects binding to FG-repeat nucleoporins and nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem*, 277(11): 9242-6.
- Katahira J, Strasser K, Podtelejnikov A, Mann M, Jung JU, Hurt E: (1999). The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J*, 18(9): 2593-609.
- Kedersha N, Anderson P: (2007). Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol*, 431: 61-81.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P: (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*, 169(6): 871-84.
- Keminer O, Peters R: (1999). Permeability of single nuclear pores. *Biophys J*, 77(1): 217-28.

- Kessler MM, Henry MF, Shen E, Zhao J, Gross S, Silver PA, Moore CL: (1997). Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast. *Genes Dev*, 11(19): 2545-56.
- Kim Guisbert K, Duncan K, Li H, Guthrie C: (2005). Functional specificity of shuttling hnRNPs revealed by genome-wide analysis of their RNA binding profiles. *RNA*, 11(4): 383-93.
- Kim VN, Kataoka N, Dreyfuss G: (2001). Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science*, 293(5536): 1832-6.
- King NL *et al.*: (2006). Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* proteome with PeptideAtlas. *Genome Biol*, 7(11): R106.
- Kiseleva E, Allen TD, Rutherford S, Bucci M, Wentz SR, Goldberg MW: (2004). Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments. *J Struct Biol*, 145(3): 272-88.
- Kobayashi T, Funakoshi Y, Hoshino S, Katada T: (2004). The GTP-binding release factor eRF3 as a key mediator coupling translation termination to mRNA decay. *J Biol Chem*, 279(44): 45693-700.
- Kohler A, Hurt E: (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10): 761-73.
- Kosova B, Pante N, Rollenhagen C, Podtelejnikov A, Mann M, Aeby U, Hurt E: (2000). Mlp2p, a component of nuclear pore attached intranuclear filaments, associates with nic96p. *J Biol Chem*, 275(1): 343-50.
- Kozak M: (2001). Constraints on reinitiation of translation in mammals. *Nucleic Acids Res*, 29(24): 5226-32.
- Kozak M: (2003). Alternative ways to think about mRNA sequences and proteins that appear to promote internal initiation of translation. *Gene*, 318: 1-23.
- Kozak M: (2004). How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs? *Gene*, 343(1): 41-54.
- Krebber H, Taura T, Lee MS, Silver PA: (1999). Uncoupling of the hnRNP Npl3p from mRNAs during the stress-induced block in mRNA export. *Genes Dev*, 13(15): 1994-2004.
- Krecic AM, Swanson MS: (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, 11(3): 363-71.
- Kressler D, Linder P, de La Cruz J: (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 19(12): 7897-912.
- Krogan NJ *et al.*: (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell*, 13(2): 225-39.
- Kunzler M, Hurt E: (2001). Targeting of Ran: variation on a common theme? *J Cell Sci*, 114(Pt 18): 3233-41.
- Kutay U, Guttinger S: (2005). Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol*, 15(3): 121-4.
- Kutay U, Hartmann E, Treichel N, Calado A, Carmo-Fonseca M, Prehn S, Kraft R, Gorlich D, Bischoff FR: (2000). Identification of two novel RanGTP-binding proteins belonging to the importin beta superfamily. *J Biol Chem*, 275(51): 40163-8.
- Kutay U, Panse VG: (2008). Gle1 does double duty. *Cell*, 134(4): 564-6.
- Lafontaine D, Vandenhaute J, Tollervey D: (1995). The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev*, 9(20): 2470-81.
- Lafontaine DL, Preiss T, Tollervey D: (1998). Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? *Mol Cell Biol*, 18(4): 2360-70.

- Lafontaine DL, Tollervey D: (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(7): 514-20.
- Lai MC, Tarn WY: (2004). Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J Biol Chem*, 279(30): 31745-9.
- Lamond AI: (1991). ASF/SF2: a splice site selector. *Trends Biochem Sci*, 16(12): 452-3.
- Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ: (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J*, 19(24): 6860-9.
- Lebreton A, Saveanu C, Decourty L, Rain JC, Jacquier A, Fromont-Racine M: (2006). A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. *J Cell Biol*, 173(3): 349-60.
- Lee DC, Aitchison JD: (1999). Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and Rna. *J Biol Chem*, 274(41): 29031-7.
- Lee MS, Henry M, Silver PA: (1996). A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev*, 10(10): 1233-46.
- Leeds P, Peltz SW, Jacobson A, Culbertson MR: (1991). The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev*, 5(12A): 2303-14.
- Leeds P, Wood JM, Lee BS, Culbertson MR: (1992). Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 12(5): 2165-77.
- Legrain P, Rosbash M: (1989). Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell*, 57(4): 573-83.
- Lei EP, Krebber H, Silver PA: (2001). Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev*, 15(14): 1771-82.
- Lei EP, Stern CA, Fahrenkrog B, Krebber H, Moy TI, Aebi U, Silver PA: (2003). Sac3 is an mRNA export factor that localizes to cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex. *Mol Biol Cell*, 14(3): 836-47.
- Lejeune F, Ishigaki Y, Li X, Maquat LE: (2002). The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J*, 21(13): 3536-45.
- Lejeune F, Maquat LE: (2005). Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3): 309-15.
- Lelivelt MJ, Culbertson MR: (1999). Yeast Upf proteins required for RNA surveillance affect global expression of the yeast transcriptome. *Mol Cell Biol*, 19(10): 6710-9.
- Linder P: (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res*, 34(15): 4168-80.
- Linder P: (2008). mRNA export: RNP remodeling by DEAD-box proteins. *Curr Biol*, 18(7): R297-9.
- Linder P, Dageron MC: (2000). Are DEAD-box proteins becoming respectable helicases? *Nat Struct Biol*, 7(2): 97-9.
- Linder P, Slonimski PP: (1988). Sequence of the genes TIF1 and TIF2 from *Saccharomyces cerevisiae* coding for a translation initiation factor. *Nucleic Acids Res*, 16(21): 10359.
- Linder P, Stutz F: (2001). mRNA export: travelling with DEAD box proteins. *Curr Biol*, 11(23): R961-3.
- Liu Y, Liang S, Tartakoff AM: (1996). Heat shock disassembles the nucleolus and inhibits nuclear protein import and poly(A)⁺ RNA export. *EMBO J*, 15(23): 6750-7.
- Lo KY, Johnson AW: (2009). Reengineering ribosome export. *Mol Biol Cell*, 20(5): 1545-54.

- Long RM, Singer RH, Meng X, Gonzalez I, Nasmyth K, Jansen RP: (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science*, 277(5324): 383-7.
- Lund MK, Guthrie C: (2005). The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. *Mol Cell*, 20(4): 645-51.
- Lund MK, Kress TL, Guthrie C: (2008). Autoregulation of Npl3, a yeast SR protein, requires a novel downstream region and serine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 28(11): 3873-81.
- Luo MJ, Reed R: (1999). Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26): 14937-42.
- Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA: (2000). Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell*, 103(7): 1121-31.
- Macara IG: (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(4): 570-94, table of contents.
- Major LL, Poole ES, Dalphin ME, Mannering SA, Tate WP: (1996). Is the in-frame termination signal of the Escherichia coli release factor-2 frameshift site weakened by a particularly poor context? *Nucleic Acids Res*, 24(14): 2673-8.
- Mangus DA, Evans MC, Jacobson A: (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol*, 4(7): 223.
- Maquat LE: (2001). The power of point mutations. *Nat Genet*, 27(1): 5-6.
- Maquat LE: (2002). Nonsense-mediated mRNA decay. *Curr Biol*, 12(6): R196-7.
- Maquat LE: (2005). Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci*, 118(Pt 9): 1773-6.
- Mattaj JW, Englmeier L: (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem*, 67: 265-306.
- Maul GG: (1977). The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution, and evolution. *Int Rev Cytol Suppl*(6): 75-186.
- McBride AE, Cook JT, Stemmler EA, Rutledge KL, McGrath KA, Rubens JA: (2005). Arginine methylation of yeast mRNA-binding protein Npl3 directly affects its function, nuclear export, and intranuclear protein interactions. *J Biol Chem*, 280(35): 30888-98.
- McCaughan KK, Brown CM, Dalphin ME, Berry MJ, Tate WP: (1995). Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12): 5431-5.
- Mendell JT, ap Rhys CM, Dietz HC: (2002). Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science*, 298(5592): 419-22.
- Mendell JT, Dietz HC: (2001). When the message goes awry: disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell*, 107(4): 411-4.
- Mendell JT, Sharifi NA, Meyers JL, Martinez-Murillo F, Dietz HC: (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet*, 36(10): 1073-8.
- Menne TF, Goyenechea B, Sanchez-Puig N, Wong CC, Tonkin LM, Ancliff PJ, Brost RL, Costanzo M, Boone C, Warren AJ: (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet*, 39(4): 486-95.
- Menon BB, Sarma NJ, Pasula S, Deminoff SJ, Willis KA, Barbara KE, Andrews B, Santangelo GM: (2005). Reverse recruitment: the Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(16): 5749-54.

- Merkulova TI, Frolova LY, Lazar M, Camonis J, Kisselev LL: (1999). C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their in vivo interaction. *FEBS Lett*, 443(1): 41-7.
- Mewes HW *et al.*: (1997). Overview of the yeast genome. *Nature*, 387(6632 Suppl): 7-65.
- Meyer AE, Hung NJ, Yang P, Johnson AW, Craig EA: (2007). The specialized cytosolic J-protein, Jjj1, functions in 60S ribosomal subunit biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(5): 1558-63.
- Michlewski G, Sanford JR, Caceres JF: (2008). The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell*, 30(2): 179-89.
- Milkereit P, Gadai O, Podtelejnikov A, Trumtel S, Gas N, Petfalski E, Tollervey D, Mann M, Hurt E, Tschochner H: (2001). Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell*, 105(4): 499-509.
- Milkereit P, Kuhn H, Gas N, Tschochner H: (2003a). The pre-ribosomal network. *Nucleic Acids Res*, 31(3): 799-804.
- Milkereit P, Strauss D, Bassler J, Gadai O, Kuhn H, Schutz S, Gas N, Lechner J, Hurt E, Tschochner H: (2003b). A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits. *J Biol Chem*, 278(6): 4072-81.
- Miller AL, Suntharalingam M, Johnson SL, Audhya A, Emr SD, Wente SR: (2004). Cytoplasmic inositol hexakisphosphate production is sufficient for mediating the Gle1-mRNA export pathway. *J Biol Chem*, 279(49): 51022-32.
- Milligan L, Torchet C, Allmang C, Shipman T, Tollervey D: (2005). A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation. *Mol Cell Biol*, 25(22): 9996-10004.
- Mingot JM, Kostka S, Kraft R, Hartmann E, Gorlich D: (2001). Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J*, 20(14): 3685-94.
- Minvielle-Sebastia L, Beyer K, Krecic AM, Hector RE, Swanson MS, Keller W: (1998). Control of cleavage site selection during mRNA 3' end formation by a yeast hnRNP. *EMBO J*, 17(24): 7454-68.
- Mitchell P, Tollervey D: (2003). An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol Cell*, 11(5): 1405-13.
- Moore MJ: (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, 309(5740): 1514-8.
- Moy TI, Silver PA: (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev*, 13(16): 2118-33.
- Moy TI, Silver PA: (2002). Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *J Cell Sci*, 115(Pt 14): 2985-95.
- Muhlrad D, Decker CJ, Parker R: (1995). Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. *Mol Cell Biol*, 15(4): 2145-56.
- Muhlrad D, Parker R: (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature*, 370(6490): 578-81.
- Nachury MV, Weis K: (1999). The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17): 9622-7.
- Nakamura A, Amikura R, Hanyu K, Kobayashi S: (2001). Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 128(17): 3233-42.
- Nakielnny S, Dreyfuss G: (1997). Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 9(3): 420-9.
- Nakielnny S, Dreyfuss G: (1998). Import and export of the nuclear protein import receptor transportin by a mechanism independent of GTP hydrolysis. *Curr Biol*, 8(2): 89-95.

- Napetschnig J, Blobel G, Hoelz A: (2007). Crystal structure of the N-terminal domain of the human protooncogene Nup214/CAN. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(6): 1783-8.
- Napetschnig J, Kassube SA, Debler EW, Wong RW, Blobel G, Hoelz A: (2009). Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup214 and the DEAD-box helicase Ddx19. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(9): 3089-94.
- Neville M, Rosbash M: (1999). The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 18(13): 3746-56.
- Nissan TA, Bassler J, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E: (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *EMBO J*, 21(20): 5539-47.
- Nissan TA, Galani K, Maco B, Tollervey D, Aebi U, Hurt E: (2004). A pre-ribosome with a tadpole-like structure functions in ATP-dependent maturation of 60S subunits. *Mol Cell*, 15(2): 295-301.
- Nott A, Le Hir H, Moore MJ: (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev*, 18(2): 210-22.
- Odom AR, Stahlberg A, Wenthe SR, York JD: (2000). A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science*, 287(5460): 2026-9.
- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Shatsky IN, Hentze MW: (2001). Lipoxxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell*, 104(2): 281-90.
- Pachler K *et al.*: (2004). Functional interaction in establishment of ribosomal integrity between small subunit protein rpS6 and translational regulator rpL10/Grc5p. *FEMS Yeast Res*, 5(3): 271-80.
- Page MF, Carr B, Anders KR, Grimson A, Anderson P: (1999). SMG-2 is a phosphorylated protein required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans* and related to Upf1p of yeast. *Mol Cell Biol*, 19(9): 5943-51.
- Palacios IM, Gatfield D, St Johnston D, Izaurralde E: (2004). An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, 427(6976): 753-7.
- Palancade B, Zuccolo M, Loeillet S, Nicolas A, Doye V: (2005). Pml39, a novel protein of the nuclear periphery required for nuclear retention of improper messenger ribonucleoparticles. *Mol Biol Cell*, 16(11): 5258-68.
- Palmeri D, Malim MH: (1999). Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol*, 19(2): 1218-25.
- Pante N, Kann M: (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*, 13(2): 425-34.
- Parker R, Sheth U: (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*, 25(5): 635-46.
- Parker R, Song H: (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 11(2): 121-7.
- Pemberton LF, Blobel G, Rosenblum JS: (1998). Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol*, 10(3): 392-9.
- Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU: (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13): 7029-36.
- Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU: (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature*, 403(6767): 332-5.
- Phan L, Zhang X, Asano K, Anderson J, Vornlocher HP, Greenberg JR, Qin J, Hinnebusch AG: (1998). Identification of a translation initiation factor 3 (eIF3) core complex,

- conserved in yeast and mammals, that interacts with eIF5. *Mol Cell Biol*, 18(8): 4935-46.
- Politz JC, Tuft RA, Pederson T, Singer RH: (1999). Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr Biol*, 9(6): 285-91.
- Politz JC, Tuft RA, Prasanth KV, Baudendistel N, Fogarty KE, Lifshitz LM, Langowski J, Spector DL, Pederson T: (2006). Rapid, diffusional shuttling of poly(A) RNA between nuclear speckles and the nucleoplasm. *Mol Biol Cell*, 17(3): 1239-49.
- Poole ES, Brown CM, Tate WP: (1995). The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 14(1): 151-8.
- Portman DS, O'Connor JP, Dreyfuss G: (1997). YRA1, an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene, encodes a novel nuclear protein with RNA annealing activity. *RNA*, 3(5): 527-37.
- Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL: (2005). Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell*, 123(2): 249-63.
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ: (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, 108(4): 501-12.
- Raitskin O, Angenitzki M, Sperling J, Sperling R: (2002). Large nuclear RNP particles--the nuclear pre-mRNA processing machine. *J Struct Biol*, 140(1-3): 123-30.
- Rajkowitsch L, Vilela C, Berthelot K, Ramirez CV, McCarthy JE: (2004). Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast. *J Mol Biol*, 335(1): 71-85.
- Ramakrishnan V, Moore PB: (2001). Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr Opin Struct Biol*, 11(2): 144-54.
- Rayala HJ, Kendirgi F, Barry DM, Majerus PW, Wentz SR: (2004). The mRNA export factor human Gle1 interacts with the nuclear pore complex protein Nup155. *Mol Cell Proteomics*, 3(2): 145-55.
- Reed R, Cheng H: (2005). TREX, SR proteins and export of mRNA. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3): 269-73.
- Reed R, Hurt E: (2002). A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell*, 108(4): 523-31.
- Reichelt R, Holzenburg A, Buhle EL, Jr., Jarnik M, Engel A, Aebi U: (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol*, 110(4): 883-94.
- Ribbeck K, Gorlich D: (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J*, 20(6): 1320-30.
- Ribbeck K, Kutay U, Paraskeva E, Gorlich D: (1999). The translocation of transport-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr Biol*, 9(1): 47-50.
- Rocak S, Linder P: (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(3): 232-41.
- Rodrigues JP, Rode M, Gatfield D, Blencowe BJ, Carmo-Fonseca M, Izaurralde E: (2001). REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(3): 1030-5.
- Rodriguez-Navarro S, Fischer T, Luo MJ, Antunez O, Brettschneider S, Lechner J, Perez-Ortin JE, Reed R, Hurt E: (2004). Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell*, 116(1): 75-86.
- Rodriguez MS, Dargemont C, Stutz F: (2004). Nuclear export of RNA. *Biol Cell*, 96(8): 639-55.

- Rollenhagen C, Hodge CA, Cole CN: (2004). The nuclear pore complex and the DEAD box protein Rat8p/Dbp5p have nonessential features which appear to facilitate mRNA export following heat shock. *Mol Cell Biol*, 24(11): 4869-79.
- Rollenhagen C, Hodge CA, Cole CN: (2007). Following temperature stress, export of heat shock mRNA occurs efficiently in cells with mutations in genes normally important for mRNA export. *Eukaryot Cell*, 6(3): 505-13.
- Rondon AG, Jimeno S, Garcia-Rubio M, Aguilera A: (2003). Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation. *J Biol Chem*, 278(40): 39037-43.
- Rouquette J, Choismel V, Gleizes PE: (2005). Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO J*, 24(16): 2862-72.
- Rout MP, Aitchison JD: (2001). The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem*, 276(20): 16593-6.
- Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT: (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, 148(4): 635-51.
- Rout MP, Blobel G: (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 123(4): 771-83.
- Russell I, Tollervey D: (1995). Yeast Nop3p has structural and functional similarities to mammalian pre-mRNA binding proteins. *Eur J Cell Biol*, 66(3): 293-301.
- Russell ID, Tollervey D: (1992). NOP3 is an essential yeast protein which is required for pre-rRNA processing. *J Cell Biol*, 119(4): 737-47.
- Ryan KJ, Wentz SR: (2000). The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*, 12(3): 361-71.
- Saavedra CA, Hammell CM, Heath CV, Cole CN: (1997). Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Rip1p. *Genes Dev*, 11(21): 2845-56.
- Saguez C, Olesen JR, Jensen TH: (2005). Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3): 287-93.
- Salas-Marco J, Bedwell DM: (2004). GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. *Mol Cell Biol*, 24(17): 7769-78.
- Sanford JR, Coutinho P, Hackett JA, Wang X, Ranahan W, Caceres JF: (2008). Identification of nuclear and cytoplasmic mRNA targets for the shuttling protein SF2/ASF. *PLoS ONE*, 3(10): e3369.
- Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, Caceres JF: (2004). A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev*, 18(7): 755-68.
- Santos-Rosa H, Moreno H, Simos G, Segref A, Fahrenkrog B, Pante N, Hurt E: (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol*, 18(11): 6826-38.
- Scarcelli JJ, Viggiano S, Hodge CA, Heath CV, Amberg DC, Cole CN: (2008). Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae* provides evidence for an interaction between RAT8/DBP5 and genes encoding P-body components. *Genetics*, 179(4): 1945-55.
- Schafer T, Strauss D, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E: (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J*, 22(6): 1370-80.
- Schlenstedt G, Hurt E, Doye V, Silver PA: (1993). Reconstitution of nuclear protein transport with semi-intact yeast cells. *J Cell Biol*, 123(4): 785-98.
- Schmid M, Arib G, Laemmli C, Nishikawa J, Durussel T, Laemmli UK: (2006). Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast. *Mol Cell*, 21(3): 379-91.

- Schmitt C *et al.*: (1999). Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *EMBO J*, 18(15): 4332-47.
- Schuwirth BS, Borovinskaya MA, Hau CW, Zhang W, Vila-Sanjurjo A, Holton JM, Cate JH: (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 310(5749): 827-34.
- Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, Luhrmann R, Hurt E: (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J*, 16(11): 3256-71.
- Seiser RM, Sundberg AE, Wollam BJ, Zobel-Thropp P, Baldwin K, Spector MD, Lycan DE: (2006). Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 174(2): 679-91.
- Senger B, Lafontaine DL, Graindorge JS, Gadad O, Camasses A, Sanni A, Garnier JM, Breitenbach M, Hurt E, Fasiolo F: (2001). The nucleolar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Mol Cell*, 8(6): 1363-73.
- Senger B, Simos G, Bischoff FR, Podtelejnikov A, Mann M, Hurt E: (1998). Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *EMBO J*, 17(8): 2196-207.
- Serin G, Gersappe A, Black JD, Aronoff R, Maquat LE: (2001). Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol Cell Biol*, 21(1): 209-23.
- Shav-Tal Y, Darzacq X, Shenoy SM, Fusco D, Janicki SM, Spector DL, Singer RH: (2004). Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science*, 304(5678): 1797-800.
- Shen EC, Henry MF, Weiss VH, Valentini SR, Silver PA, Lee MS: (1998). Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev*, 12(5): 679-91.
- Shen EC, Stage-Zimmermann T, Chui P, Silver PA: (2000). The yeast mRNA-binding protein Npl3p interacts with the cap-binding complex. *J Biol Chem*, 275(31): 23718-24.
- Sheth U, Parker R: (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300(5620): 805-8.
- Shibuya T, Tange TO, Sonenberg N, Moore MJ: (2004). eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat Struct Mol Biol*, 11(4): 346-51.
- Shyu AB, Wilkinson MF, van Hoof A: (2008). Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J*, 27(3): 471-81.
- Si K, Maitra U: (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor. *Mol Cell Biol*, 19(2): 1416-26.
- Siebel CW, Feng L, Guthrie C, Fu XD: (1999). Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10): 5440-5.
- Singleton DR, Chen S, Hitomi M, Kumagai C, Tartakoff AM: (1995). A yeast protein that bidirectionally affects nucleocytoplasmic transport. *J Cell Sci*, 108 (Pt 1): 265-72.
- Smillie DA, Sommerville J: (2002). RNA helicase p54 (DDX6) is a shuttling protein involved in nuclear assembly of stored mRNP particles. *J Cell Sci*, 115(Pt 2): 395-407.
- Snay-Hodge CA, Colot HV, Goldstein AL, Cole CN: (1998). Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *EMBO J*, 17(9): 2663-76.

- Sopko R *et al.*: (2006). Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol Cell*, 21(3): 319-30.
- Stage-Zimmermann T, Schmidt U, Silver PA: (2000). Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo. *Mol Biol Cell*, 11(11): 3777-89.
- Stansfield I, Akhmaloka, Tuite MF: (1995a). A mutant allele of the SUP45 (SAL4) gene of *Saccharomyces cerevisiae* shows temperature-dependent allosuppressor and omnipotent suppressor phenotypes. *Curr Genet*, 27(5): 417-26.
- Stansfield I, Jones KM, Kushnirov VV, Dagkesamanskaya AR, Poznyakovski AI, Paushkin SV, Nierras CR, Cox BS, Ter-Avanesyan MD, Tuite MF: (1995b). The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 14(17): 4365-73.
- Stewart M: (2007). Ratcheting mRNA out of the nucleus. *Mol Cell*, 25(3): 327-30.
- Stewart M, Baker RP, Bayliss R, Clayton L, Grant RP, Littlewood T, Matsuura Y: (2001). Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett*, 498(2-3): 145-9.
- Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U: (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 11(3): 391-401.
- Stoffler D, Feja B, Fahrenkrog B, Walz J, Typke D, Aebi U: (2003). Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol*, 328(1): 119-30.
- Stojdl DF, Bell JC: (1999). SR protein kinases: the splice of life. *Biochem Cell Biol*, 77(4): 293-8.
- Strahm Y, Fahrenkrog B, Zenklusen D, Rychner E, Kantor J, Rosbach M, Stutz F: (1999). The RNA export factor Gle1p is located on the cytoplasmic fibrils of the NPC and physically interacts with the FG-nucleoporin Rip1p, the DEAD-box protein Rat8p/Dbp5p and a new protein Ymr 255p. *EMBO J*, 18(20): 5761-77.
- Strasser K, Bassler J, Hurt E: (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol*, 150(4): 695-706.
- Strasser K, Hurt E: (1999). Nuclear RNA export in yeast. *FEBS Lett*, 452(1-2): 77-81.
- Strasser K *et al.*: (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, 417(6886): 304-8.
- Strawn LA, Shen T, Wentz SR: (2001). The GLFG regions of Nup116p and Nup100p serve as binding sites for both Kap95p and Mex67p at the nuclear pore complex. *J Biol Chem*, 276(9): 6445-52.
- Strom AC, Weis K: (2001). Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol*, 2(6): REVIEWS3008.
- Stutz F, Bachi A, Doerks T, Braun IC, Seraphin B, Wilm M, Bork P, Izaurralde E: (2000). REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA*, 6(4): 638-50.
- Stutz F, Izaurralde E: (2003). The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol*, 13(6): 319-27.
- Stutz F, Rosbash M: (1998). Nuclear RNA export. *Genes Dev*, 12(21): 3303-19.
- Suntharalingam M, Alcazar-Roman AR, Wentz SR: (2004). Nuclear export of the yeast mRNA-binding protein Nab2 is linked to a direct interaction with Gfd1 and to Gle1 function. *J Biol Chem*, 279(34): 35384-91.
- Sutcliffe P, Shafer BK, Strathern JN, Hughes SH: (1994). Isolation, identification and characterization of the FUN12 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 146(2): 209-13.
- Svitkin YV, Sonenberg N: (2006). [Translational control by the poly(A) binding protein: a check for mRNA integrity]. *Mol Biol (Mosk)*, 40(4): 684-93.

- Takemura R, Inoue Y, Izawa S: (2004). Stress response in yeast mRNA export factor: reversible changes in Rat8p localization are caused by ethanol stress but not heat shock. *J Cell Sci*, 117(Pt 18): 4189-97.
- Tanner NK, Cordin O, Banroques J, Doere M, Linder P: (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell*, 11(1): 127-38.
- Tate WP, Poole ES, Horsfield JA, Mannering SA, Brown CM, Moffat JG, Dalphin ME, McCaughan KK, Major LL, Wilson DN: (1995). Translational termination efficiency in both bacteria and mammals is regulated by the base following the stop codon. *Biochem Cell Biol*, 73(11-12): 1095-103.
- Tran EJ, Wentz SR: (2006). Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell*, 125(6): 1041-53.
- Tran EJ, Zhou Y, Corbett AH, Wentz SR: (2007). The DEAD-box protein Dbp5 controls mRNA export by triggering specific RNA:protein remodeling events. *Mol Cell*, 28(5): 850-9.
- Truant R, Cullen BR: (1999). The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol*, 19(2): 1210-7.
- Tschochner H, Hurt E: (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, 13(5): 255-63.
- Tseng-Rogenski SS, Chong JL, Thomas CB, Enomoto S, Berman J, Chang TH: (2003). Functional conservation of Dhh1p, a cytoplasmic DExD/H-box protein present in large complexes. *Nucleic Acids Res*, 31(17): 4995-5002.
- Tseng SS, Weaver PL, Liu Y, Hitomi M, Tartakoff AM, Chang TH: (1998). Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)⁺ RNA export. *EMBO J*, 17(9): 2651-62.
- Uchida N, Hoshino S, Imataka H, Sonenberg N, Katada T: (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem*, 277(52): 50286-92.
- Vainberg IE, Dower K, Rosbash M: (2000). Nuclear export of heat shock and non-heat-shock mRNA occurs via similar pathways. *Mol Cell Biol*, 20(11): 3996-4005.
- Valentini SR, Weiss VH, Silver PA: (1999). Arginine methylation and binding of Hrp1p to the efficiency element for mRNA 3'-end formation. *RNA*, 5(2): 272-80.
- van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Seraphin B: (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J*, 21(24): 6915-24.
- Vanrobays E, Gelugne JP, Caizergues-Ferrer M, Lafontaine DL: (2004). Dim2p, a KH-domain protein required for small ribosomal subunit synthesis. *RNA*, 10(4): 645-56.
- Vasu SK, Forbes DJ: (2001). Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 13(3): 363-75.
- Venema J, Tollervey D: (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, 33: 261-311.
- Venter JC *et al.*: (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507): 1304-51.
- Vinciguerra P, Iglesias N, Camblong J, Zenklusen D, Stutz F: (2005). Perinuclear Mlp proteins downregulate gene expression in response to a defect in mRNA export. *EMBO J*, 24(4): 813-23.
- Vinciguerra P, Stutz F: (2004). mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr Opin Cell Biol*, 16(3): 285-92.
- Viphakone N, Voisinet-Hakil F, Minvielle-Sebastia L: (2008). Molecular dissection of mRNA poly(A) tail length control in yeast. *Nucleic Acids Res*, 36(7): 2418-33.

- von der Haar T, Tuite MF: (2007). Regulated translational bypass of stop codons in yeast. *Trends Microbiol*, 15(2): 78-86.
- von Moeller H, Basquin C, Conti E: (2009). The mRNA export protein DBP5 binds RNA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner. *Nat Struct Mol Biol*, 16(3): 247-54.
- Wahle E, Ruegsegger U: (1999). 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 23(3): 277-95.
- Wakem LP, Sherman F: (1990). Isolation and characterization of omnipotent suppressors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 124(3): 515-22.
- Wang J, Xiao SH, Manley JL: (1998). Genetic analysis of the SR protein ASF/SF2: interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev*, 12(14): 2222-33.
- Warner JR: (1971). The assembly of ribosomes in yeast. *J Biol Chem*, 246(2): 447-54.
- Watkins JL, Murphy R, Emtage JL, Went SR: (1998). The human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Gle1p is required for poly(A)⁺ RNA export. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12): 6779-84.
- Weirich CS, Erzberger JP, Berger JM, Weis K: (2004). The N-terminal domain of Nup159 forms a beta-propeller that functions in mRNA export by tethering the helicase Dbp5 to the nuclear pore. *Mol Cell*, 16(5): 749-60.
- Weirich CS, Erzberger JP, Flick JS, Berger JM, Thorner J, Weis K: (2006). Activation of the DExD/H-box protein Dbp5 by the nuclear-pore protein Gle1 and its coactivator InsP6 is required for mRNA export. *Nat Cell Biol*, 8(7): 668-76.
- Wente SR: (2000). Gatekeepers of the nucleus. *Science*, 288(5470): 1374-7.
- West M, Hedges JB, Chen A, Johnson AW: (2005). Defining the order in which Nmd3p and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits. *Mol Cell Biol*, 25(9): 3802-13.
- West M, Hedges JB, Lo KY, Johnson AW: (2007). Novel interaction of the 60S ribosomal subunit export adapter Nmd3 at the nuclear pore complex. *J Biol Chem*, 282(19): 14028-37.
- Wiegand HL, Coburn GA, Zeng Y, Kang Y, Bogerd HP, Cullen BR: (2002). Formation of Tap/NXT1 heterodimers activates Tap-dependent nuclear mRNA export by enhancing recruitment to nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol*, 22(1): 245-56.
- Wilkinson MF, Shyu AB: (2002). RNA surveillance by nuclear scanning? *Nat Cell Biol*, 4(6): E144-7.
- Wilson SM, Datar KV, Paddy MR, Swedlow JR, Swanson MS: (1994). Characterization of nuclear polyadenylated RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 127(5): 1173-84.
- Windgassen M, Krebber H: (2003). Identification of Gbp2 as a novel poly(A)⁺ RNA-binding protein involved in the cytoplasmic delivery of messenger RNAs in yeast. *EMBO Rep*, 4(3): 278-83.
- Windgassen M, Sturm D, Cajigas IJ, Gonzalez CI, Seedorf M, Bastians H, Krebber H: (2004). Yeast shuttling SR proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are part of the translating mRNPs, and Npl3p can function as a translational repressor. *Mol Cell Biol*, 24(23): 10479-91.
- Winzler EA *et al.*: (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285(5429): 901-6.
- Xu C, Henry MF: (2004). Nuclear export of hnRNP Hrp1p and nuclear export of hnRNP Npl3p are linked and influenced by the methylation state of Npl3p. *Mol Cell Biol*, 24(24): 10742-56.
- Yang Q, Del Campo M, Lambowitz AM, Jankowsky E: (2007). DEAD-box proteins unwind duplexes by local strand separation. *Mol Cell*, 28(2): 253-63.

- Yang Q, Rout MP, Akey CW: (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell*, 1(2): 223-34.
- Yao W, Lutzmann M, Hurt E: (2008). A versatile interaction platform on the Mex67-Mtr2 receptor creates an overlap between mRNA and ribosome export. *EMBO J*, 27(1): 6-16.
- Yao W, Roser D, Kohler A, Bradatsch B, Bassler J, Hurt E: (2007). Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol Cell*, 26(1): 51-62.
- Yeh LC, Lee JC: (1998). Yeast ribosomal proteins L4, L17, L20, and L25 exhibit different binding characteristics for the yeast 35S precursor rRNA. *Biochim Biophys Acta*, 1443(1-2): 139-48.
- York JD, Odom AR, Murphy R, Ives EB, Wentz SR: (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science*, 285(5424): 96-100.
- Yoshida K, Blobel G: (2001). The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol*, 152(4): 729-40.
- Yu MC, Bachand F, McBride AE, Komili S, Casolari JM, Silver PA: (2004). Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev*, 18(16): 2024-35.
- Yun CY, Fu XD: (2000). Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 150(4): 707-18.
- Yun CY, Velazquez-Dones AL, Lyman SK, Fu XD: (2003). Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J Biol Chem*, 278(20): 18050-5.
- Zachar Z, Kramer J, Mims IP, Bingham PM: (1993). Evidence for channeled diffusion of pre-mRNAs during nuclear RNA transport in metazoans. *J Cell Biol*, 121(4): 729-42.
- Zemp I, Kutay U: (2007). Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett*, 581(15): 2783-93.
- Zenklusen D, Stutz F: (2001). Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett*, 498(2-3): 150-6.
- Zenklusen D, Vinciguerra P, Strahm Y, Stutz F: (2001). The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p. *Mol Cell Biol*, 21(13): 4219-32.
- Zenklusen D, Vinciguerra P, Wyss JC, Stutz F: (2002). Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol*, 22(23): 8241-53.
- Zhang S, Ruiz-Echevarria MJ, Quan Y, Peltz SW: (1995). Identification and characterization of a sequence motif involved in nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol*, 15(4): 2231-44.
- Zhao J, Hyman L, Moore C: (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(2): 405-45.
- Zhao J, Jin SB, Bjorkroth B, Wieslander L, Daneholt B: (2002). The mRNA export factor Dbp5 is associated with Balbiani ring mRNP from gene to cytoplasm. *EMBO J*, 21(5): 1177-87.
- Zhouravleva G, Frolova L, Le Goff X, Le Guellec R, Inge-Vechtomov S, Kisselev L, Philippe M: (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J*, 14(16): 4065-72.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Abkürzungen für Chemikalien und Puffer wurden in den Abschnitten 2 Materialien und 3 Methoden erläutert. Chemische Elemente und Verbindungen wurden dem internationalen Standard entsprechend abgekürzt. Aminosäuren wurden im Ein-Buchstaben-Code nach dem internationalen Standard abgekürzt.

^{32}S	radioaktiv markiertes Schwefelatom
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
ÜN	über Nacht (12-16 h)
A	Adenosin
A	Ampere
A	Absorption
aa	aminoacyl
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bromphenolblau	Tetrabromphenolsulfonphthalein
BSA	Rinderserumalbumin Fraktion V
bzw.	beziehungsweise
c	zenti (10^{-2})
C	Cytidin
ca.	circa
CBC	<i>cap-binding complex</i> (Kappenbindungskomplex)
Ci	Curie
cm^2	Quadratcentimeter
cpm	<i>counts per minute</i> (Zähleinheiten pro Minute)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DSE	<i>downstream sequence elements</i>
dT	desoxy-Thymidin
DTT	Dithiothreitol
EJC	<i>exon junction complex</i> (Exon-Junction-Komplex)
ESE	<i>exon splice enhancer</i> (Exon-Spleißverstärker)
<i>et al.</i>	und andere
Fab	<i>fragment of antigen binding</i>
Fc	<i>fragment of constant region</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FOA	<i>5-fluoroorotic acid</i> (5-Fluoroorotsäure)
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung = 9.81 m/s ²
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIS	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
InsP ₆	Inositolhexakisphosphat
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

IRES	<i>internal ribosomal entry site</i> (internen Ribosomen-Eintrittsstelle)
k	kilo (10^3)
kb	Kilobasen
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
KOAc	Kaliumacetat
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LEU	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
M	Molar
M	Mega (10^6)
m	Meter
m	milli (10^{-3})
miRNA	<i>micro RNA</i>
min	Minute(n)
mol	Mol
myc	Myelocytomatose protein
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
mRNP	<i>messenger RNP</i>
n	nano (10^{-9})
NES	<i>nuclear export signal</i> (nukleäres Exportsignal)
NLS	<i>nuclear localization signal</i> (nukleäres Lokalisierungssignal)
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i> (Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau)
NP-40	Nonidet P-40
NPC	<i>nuclear pore complex</i> (Kernporenkomplex)
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	<i>optical density</i> (optische Dichte)
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p	piko (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphat buffer solution</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBSMKT	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit $MgCl_2$, KCl und Triton X-100

PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTC	<i>premature termination codon</i> (verfrühtes Stopp-Kodon)
rDNA	ribosomale DNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure, RNS)
RNase A	Ribonuklease A
RNP	<i>ribonucleoprotein particle</i> (Ribonukleoproteinpartikel)
RRM	<i>RNA recognition motif</i> (RNA-Erkennungsmotiv)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SD-Medium	<i>synthetic dropout medium</i>
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (kleine interferierende RNA)
snRNP	<i>small nuclear RNP</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i> (salzhaltiges Natriumcitrat)
ssDNA	<i>salmon sperm DNA</i> (Lachssperma DNA)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Essigsäure (Acetat)/EDTA-Puffer
TAP	<i>tandem affinity purification</i> (Tandem Affinitätsaufreinigung)
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TCA	<i>trichloracid</i> (Trichloressigsäure)
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRP	Tryptophan
tRNA	transfer RNA
U	Units

U	Uridin
uORF	<i>upstream ORF</i>
Upm	Umdrehung(en) pro Minute
URA	Uracil
UTR	<i>untranslated region</i> (untranslatierte Region)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YPD-Medium	<i>yeast extract peptone dextrose medium</i> (Hefevollmedium)
z.B.	zum Beispiel

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Thomas Groß
geb. am 28.07.1978 in Berlin
ledig

Schulbildung

August 1985 bis Juli 1992 127. Oberschule Dresden
August 1992 bis Juli 1997 Gymnasium Dresden-Plauen
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

Oktober 1998 bis September 2000	Grundstudium Biologie Technische Universität Darmstadt Abschluss: Vordiplom
Oktober 2000 bis März 2004	Hauptstudium Biologie Technische Universität Darmstadt Schwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie, Genetik, Tierphysiologie Abschluss: Diplom
März 2003 bis Dezember 2003	Diplomarbeit auf dem Gebiet der Zellbiologie Technische Universität Darmstadt Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie Betreuung: Prof. Dr. Thomas W. Holstein Thema: „Zelluläre und molekulare Analyse eines epithelial exprimierten Minikollagens aus Hydra“
seit April 2004	Promotionsarbeit in der Humanbiologie Philipps-Universität Marburg Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung Betreuung: PD Dr. Heike Krebber Thema: „Charakterisierung neuer Funktionen der mRNA-Exportfaktoren Npl3p und Dbp5p in der Translation“

8.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Darmstadt:

Böhm, Buschinger, Dancker, Engelkamp, Gassen, Giersch, Gmeiner, Göringer, Hesch, Himstedt, Holstein, Homann, Ipsen, Kletzin, Klock, Klose, Kluge, Kostron, Kraft, Langner, Layer, Lindner, Loch, Lüttge, Nixdorff, Oeschler, Poser, Pfeifer, Scheu, Schleper, Schwabe-Kratochwil, Seelig, Thiel, Veith, Walhäuser-Franke, Wegmann, Wiegand, Wirth, Wollenweber, Wollny

In Marburg:

Krebber

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich meine dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Charakterisierung neuer Funktionen
der mRNA-Exportfaktoren Npl3p und Dbp5p
in der Translation**

am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Frau PD Dr. Heike Krebber (Fachbereich Medizin) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde wie folgt veröffentlicht oder wird zur Veröffentlichung vorbereitet:

Originalarbeit:

Gross T., Siepmann A., Sturm D., Windgassen M., Scarcelli J.J., Seedorf M., Cole C.N., Krebber H. (2007): The DEAD-Box RNA Helicase Dbp5 functions in translation termination. *Science*, 315, 646-649

Gross T., Hackmann A., Baierlein C., Forster N., Krebber H.: The mRNA export factor Npl3p functions in the transport of mRNAs and large ribosomal subunits to support ribosomal subunit joining for translation. in Vorbereitung

Übersichtsartikel:

Gross T. und Krebber H. (2007): mRNA-Export vom Zellkern in das Zytoplasma - und was kommt dann? *Biospektrum* 2007, 3, 260

Kongressbeiträge:

Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM),
April 2007, Osnabrück, Deutschland

Poster:

Gross T., Siepmann A., Sturm D., Windgassen M., Scarcelli J.-J., Seedorf M., Cole C.N., Krebber H.: The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination.

EMBO conference on Protein Synthesis and Translational Control, September 2007,
Heidelberg, Deutschland

Poster:

Gross T., Siepmann A., Sturm D., Windgassen M., Scarcelli J.-J., Seedorf M., Cole C.N., Krebber H.: The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination.

31st Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, März 2008, Marburg
Deutschland

Poster:

Gross T., Siepmann A., Sturm D., Windgassen M., Scarcelli J.-J., Seedorf M., Cole C.N., Krebber H.: The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination.

11th Conference on Translational Control, September 2008, Cold Spring Harbor, New
York, USA

Poster:

Gross T., Siepmann A., Sturm D., Windgassen M., Scarcelli J.-J., Seedorf M., Cole C.N., Krebber H.: The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination.

8.5 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zunächst möchte ich PD Dr. Heike Krebber für die praktische Betreuung der Doktorarbeit, die Bereitstellung dieser interessanten Themen und Fragestellungen sowie die zahlreichen Diskussionen und hilfreichen Anregungen danken. Insbesondere möchte ich mich bei Heike für die kritische Durchsicht beim Schreiben dieser Arbeit bedanken. Mein Dank gilt natürlich auch Prof. Dr. Rolf Müller für die guten Arbeitsmöglichkeiten, die mir in der Arbeitsgruppe durch ihn zur Verfügung gestellt wurden. Meinen Thesis Komitee-Mitgliedern Prof. Dr. Rolf Müller und Prof. Dr. Roland Lill danke ich für die wertvollen Ratschläge.

Für die unterstützenden Vor- und Mitarbeiten an den Themen möchte ich mich bei den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des „Krebber Lab’s“ bedanken: Merle Windgassen, Dorotheè Sturm, Anja Siepmann, Claudia Baierlein, Alexandra Hackmann und Nicole Forster sowie bei den kooperierenden Arbeitsgruppen. Ein großer Dank geht an alle ehemaligen und derzeitigen Mitglieder der Arbeitsgruppen Krebber und Bastians, für die nette Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die mir die zahlreichen Stunden im IMT angenehm gemacht haben, wodurch mir die Arbeit viel Spaß bereitete. Zusätzlich danke ich ihnen dafür, dass sie immer, wenn sie Zeit fanden, mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Unserer Sekretärin Ulrike Schülke danke ich für die schöne Zusammenarbeit sowie die Unterstützung in organisatorischen Fragen und Katrin Nowak und Caroline Bouchard für die Korrektur meines *English Summary*.

Ein besonders herzliches und riesengroßes Dankeschön geht an meine Freundin Nicole. Sie war zu jeder Zeit für mich da, hat mich in all meinen guten und schweren Zeiten begleitet und mich jederzeit in sowohl privater als auch wissenschaftlicher Hinsicht mit voller Kraft unterstützt. Zudem hat sie mit ihrem überaus hilfreichen Korrekturlesen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich weiß, dass ich sie zu weilen sehr strapaziert und vieles unbewusst von ihr vorausgesetzt habe, was nicht immer selbstverständlich war. Nichtsdestotrotz war sie stets für mich da. Ich möchte mich hiermit für ihre fortwährende Liebe und für Ihre Kraft in diesem Rahmen ganz herzlich bei ihr bedanken. Meiner gesamten Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich für ihre fortwährende, liebevolle seelische und moralische Unterstützung sowie deren Hilfe in jederlei Hinsicht herzlich danken. Ebenso danke ich meinen Papa für die Rechtschreibkontrolle meiner Arbeit.

Außerdem vielen Dank für die verschiedenartigsten Unterstützungen an alle, die mir geholfen haben und hier vergessen wurden.

**Diese Arbeit ist meiner Freundin Nicole und meinen Eltern in
Dankbarkeit und Liebe gewidmet.**